

Caroline Luiz

**NANOEMULSÕES DE ALOE VERA E ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia* E *Cymbopogon martinii*
COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA A MANCHA
ANGULAR DO MORANGUEIRO (*Xanthomonas fragariae*).**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Luiz, Caroline

Nanoemulsões de Aloe vera e óleos essenciais de
Melaleuca alternifolia e *Cymbopogon martinii* como
indutores de resistência contra a mancha angular do
morangueiro (*Xanthomonas fragariae*). / Caroline
Luiz ; orientador, Robson Marcelo Di Piero - SC,
2017.

97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Controle
Alternativo de doenças vegetais. 3. Nanoemulsões .
4. Indução de resistência . 5. Morangueiro. I. Di
Piero, Robson Marcelo . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Aos meus queridos pais, irmãos e marido
pelo amor infinito, paciência, dedicação e
amizade.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelo reconhecimento repassado;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

Ao Professor Robson Marcelo Di Piero, pela sua dedicação, amizade e ótima orientação;

À By Samia Aromaterapia, pelo fornecimento dos óleos essenciais;

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa Tarsis, Juliana, Juliane, Argus, Zamira, Bruna, Giana, Pedro, Eduardo, Julia, Ludiana, Rafael, Paulo e Camile, pelo companheirismo e ajuda durante toda a minha jornada de trabalho;

Aos meus queridos pais e irmãos, amores da minha vida, pelo carinho incondicional, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, ajudando e auxiliando em todos os momentos. Sem vocês eu não teria conseguido;

Ao meu marido Ricardo Pimenta, por toda paciência, por me auxiliar em diversas etapas do meu trabalho, pelo carinho, pela amizade e amor.

Às energias do Universo, os Deuses da natureza, pela iluminação dos bons caminhos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

ABSTRACT

Bacterial angular leaf spot disease (*Xanthomonas fragariae*) is responsible for the reduction in strawberry production. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of emulsions of tea tree or palmarosa essential oils against the angular leaf spot, seeking to elucidate their influence on the physiology and biochemistry of strawberry plants (Albion and San Andreas). Was added tea tree or palmarosa oil was added in aloe polysaccharide suspension (AP), obtaining a tea tree oil emulsion (T_{AP}) and palmarosa oil nanoemulsion (P_{AP}), respectively. Assays to verify the antimicrobial potential of AP, T_{AP} and P_{AP} were conducted. We evaluated the ability of these preparations to reduce disease and to activate plant defense. We observed that AP, T_{AP} and P_{AP} were capable of reducing the *X. fragariae* growth to 44.0%, 94.4% and 86.1%, respectively. In addition, T_{AP} and P_{AP} reduced over 100% of disease symptoms in the two cultivars. An increased superoxide dismutase, dismutase, catalase and peroxidase activity was observed in the more susceptible cultivar (Albion). Using HPLC techniques and spectrophotometric scanning, it was possible to verify the influence of the preparations on the concentration of secondary metabolites. In the foliar extract were found gallic acid, hydrochloric acid, ferric acid, benzylic acid, salicylic acid and others. In addition to the phenolic acid concentration, plants inoculated with cv. Albion, treated with AP and P_{AP}, presented accumulation of lignin. Physiological changes were also observed. It was verified that the inoculation promoted an increase in the photosynthetic rate in the cv. Albion treated with water. To evaluate the effect of the preparations containing aloe and essential oils on stomatal opening and closure, a scanning microscopy was performed. However, we did not observe an influence on the analyzed parameters. Despite this, the formation of a bacterial biofilm in the control group was verified, which was not observed or observed in a low amount on the leaf surface of the plants previously treated with T_{AP} or AP, respectively. Considering the results obtained, we believe that essential oils are an efficient alternative for the control of the angular leaf spot because they are able to reduce the severity of the disease, activate the mechanisms of vegetal defense and promote accumulations of phenolics on the leaves.

RESUMO

A *Xanthomonas fragariae* é responsável por uma redução significativa na produção do morango. Este trabalho objetivou avaliar a eficiência de óleos essenciais, polissacarídeos e de suas nanoemulsões no controle da mancha angular do morangueiro, elucidando suas influências sobre a fisiologia e bioquímica do hospedeiro. Em suspensão polissacarídica da babosa (AP), foram acrescidos o óleo de tea tree ou de palmarosa, obtendo-se a emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) e a nanoemulsão de óleo de palmarosa e (P_{AP}), respectivamente. Com os preparados realizaram-se os ensaios para avaliação do potencial antimicrobiano, redutor da severidade da doença e ativador dos mecanismos de defesa vegetal. Verificou-se que AP, T_{AP} e P_{AP} chegaram a reduzir 44%, 94,4% e 86,1% do crescimento bacteriano in vitro da *X. fragariae*, respectivamente. As preparações acrescidas de óleo de melaleuca ou palmarosa reduziram aproximadamente 100% dos sintomas da doença nas duas cultivares de morangueiro utilizadas nos experimentos (Albion e San Andreas). Sendo que a cv. Albion demonstrou-se mais suscetível ao fitopatógeno. Além disso, apenas na mais suscetível, AP, T_{AP} e P_{AP} elevaram significativamente a atividade da superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Utilizando-se as técnicas de HPLC e varredura espectrofotométrica, foi possível verificar a influência das preparações sobre a concentração de metabólitos secundários. No extrato foliar foram encontrados ácido gálico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido salicílico e entre outros. Além das alterações na concentração de ácido fenólicos, verificou-se que plantas inoculadas da cv. Albion, tratadas com AP e P_{AP} , apresentaram acúmulo de lignina. Alterações fisiológicas também foram constatadas. Neste sentido, verificou-se que a inoculação promoveu um aumento na taxa fotossintética nas plantas da cv. Albion tratadas com água. Para analisar o efeito das preparações contendo babosa e óleos essenciais sobre a abertura e fechamento estomático, efetuou-se a microscopia de varredura. No entanto, não foi possível perceber influência dos preparados sobre o parâmetro analisado. Apesar disso, verificou-se a formação de um biofilme bacteriano nas testemunhas, o qual não foi verificado ou observado em baixa quantidade na superfície foliar das plantas previamente tratadas com T_{AP} ou AP, respectivamente. Tendo em vista os resultados alcançados, acredita-se que os óleos essenciais possam ser uma alternativa eficiente para o controle da mancha angular, pois reduzem a severidade da doença, ativam mecanismos de defesa vegetal e promovem acúmulos de fenólicos sobre as folhas.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) após 21 da inoculação de morangueiros tratados com água destilada (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP), emulsão de óleo de tea tree (TAP) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (PAP). As plantas foram tratadas 4 dias antes da inoculação.....65
- Tabela 2.** Concentração de compostos fenólicos (mg.g MF⁻¹) em morangueiros da cultivar Albion e San Andreas tratados com Água (testemunha), suspensão polissacarídica a babosa (AP), emulsão de óleo de Tea tree (TAP) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (PAP) e inoculados ou não com *X. fragariae*. TR = Tempo de Retenção.....77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Varredura espectrofotométrica de morangueiros da cultivar Albion e San Andreas tratados com suspensão polissacarídica da babosa (AP); emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}); nanoemulsões de óleo de palmarosa (P_{AP}); água destilada contendo emulsificantes (controle).....67
- Figura 2.** Microscopia de fluorescência de secções transversais de folhas de morangueiros da cultivar Albion (A, B, C, D e E) e da cultivar San Andreas (F, G, H, I e J) 6 dias após o tratamento com água destilada (B e G), AP (C e H), T_{AP} (D e I) ou P_{AP} (E e J), em plantas inoculadas com *X. fragariae* 2 dias antes da coleta. A e F se referem a plantas apenas tratadas com água destilada, não inoculadas. Setas indicam acúmulo de compostos fenólicos.....70
- Figura 3.** Concentração de lignina em folhas de morangueiro (cv. Albion e cv. San Andreas) aos 6 dias após a aplicação dos tratamentos (água – controle; suspensão polissacarídica da babosa – AP; emulsão de óleo de tea tree - T_{AP}; nanoemulsão de palmarosa - P_{AP}) de plantas inoculadas ou não com *Xanthomonas fragariae*. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).....72
- Figura 4.** Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B) e transpiração (C) em folhas de morangueiros das cultivares Albion e San Andreas 6 dias após o tratamento (dat) com água destilada (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}).....79
- Figura 5.** Fluorescência inicial (F0) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) e aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com água (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}).....81
- Figura 6.** Fluorescência máxima (Fm) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com água (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}).....82
- Figura 7.** Fluorescência variável (Fv) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com água (controle), Suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}).....84

Figura 8. Microscopia de varredura da superfície foliar de morangueiros da cultivar Albion e San Andreas, inoculados ou não com *Xanthomonas fragariae*, aos 6 dias após a aplicação da suspensão polissacarídica da babosa (AP) ou emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}). San Andreas não inoculada tratada com Água (A); San Andreas não inoculada tratada com AP (B); San Andreas não inoculada tratada com T_{AP} (C); San Andreas inoculada e tratada com Água (D); San Andreas inoculada e tratada com AP (E); San Andreas inoculada e tratada com T_{AP} (F); Albion não inoculada e tratada com Água (G); Albion não inoculada tratada com AP (H); Albion não inoculada tratada com T_{AP} (I); Albion inoculada e tratada com Água (J); Albion inoculada e tratada com AP (K); Albion inoculada e tratada com T_{AP} (L).....85

SUMÁRIO

ABSTRACT	11
RESUMO	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	17
APRESENTAÇÃO	21
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	27
1.1. A CULTURA DO MORANGUEIRO	27
1.1.1. <i>Descrição botânica</i>	27
1.1.2. <i>Importância econômica</i>	27
1.1.3. <i>Mancha angular do morangueiro</i>	28
1.2. CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS	29
1.2.1. <i>Indução de resistência</i>	29
1.2.2. <i>Mecanismos de defesa vegetal</i>	31
1.2.3. <i>Estresse oxidativo nas plantas</i>	32
1.2.4. <i>Enzimas antioxidantes</i>	33
1.2.5. <i>Polissacarídeos no controle de doenças de plantas</i>	34
1.2.6. <i>Óleos essenciais no controle de doenças de plantas</i>	35
1.3. NANOEMULSÕES	36
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II – EMULSIONS OF ESSENTIAL OILS AND ALOE POLYSACCHARIDES: ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND RESISTANCE INDUCER POTENTIAL AGAINST <i>Xanthomonas fragariae</i>	47
ABSTRACT	47
REFERENCES	48
CAPÍTULO III - ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Melaleuca alternifolia</i> E <i>Cymbopogon martinii</i> NO METABOLISMO DE FENÓLICOS DE MORANGUEIRO CONTRA A MANCHA ANGULAR (<i>Xanthomonas fragariae</i>)	55
RESUMO	55
3.1. INTRODUÇÃO	56
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	58

3.2.1. <i>Material vegetal e microbiano</i>	58
3.2.2. <i>Extração dos polissacarídeos do parênquima da babosa</i>	59
3.2.3. <i>Preparo da suspensão dos polissacarídeos e das nanoemulsões</i>	59
3.2.4. <i>Aplicação das preparações e inoculação</i>	59
3.2.5. <i>Varredura espectrofotométrica</i>	60
3.2.6. <i>Microscopia de fluorescência</i>	60
3.2.7. <i>Lignina</i>	61
3.2.8. <i>HPLC</i>	62
3.2.9. <i>Análises fisiológicas</i>	63
3.2.10. <i>Microscopia de varredura</i>	64
3.2.11. <i>Análise estatística</i>	64
3.3. RESULTADOS	65
3.3.1. <i>Severidade da doença</i>	65
3.3.2. <i>Varredura espectrofotométrica</i>	66
3.3.3. <i>Microscopia de fluorescência</i>	69
3.3.4. <i>Lignina</i>	71
3.3.5. <i>HPLC</i>	73
3.3.6. <i>Taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração</i>	78
3.3.7. <i>Eficiência quântica máxima do Fotossistema II (PSII)</i>	80
3.3.8. <i>Fluorescência inicial da clorofila</i>	80
3.3.9. <i>Fluorescência máxima da clorofila</i>	82
3.3.10. <i>Fluorescência variável</i>	83
3.3.11. <i>Microscopia de varredura</i>	84
3.4. DISCUSSÃO	86
AGRADECIMENTOS	93
REFERÊNCIAS	93

APRESENTAÇÃO

A intensificação da exploração dos recursos naturais, proporcionada pelo desenvolvimento de tecnologias, tem gerado danos severos aos ecossistemas naturais, como por exemplo, o desaparecimento de massas florestais e sua fauna. O desflorestamento, inerente desta exploração, além de ser efetuado para a extração de madeira e criação animal, é realizado para implementação de monoculturas, as quais levam ao aparecimento inevitável de doenças vegetais, pragas e plantas daninhas.

Com o intuito de reduzir os problemas fitossanitários, gerados pelos métodos de cultivo atualmente empregados, o homem desenvolveu produtos químicos para o controle de doenças que, devido a sua utilização indiscriminada, causam ainda mais danos ao meio ambiente, como a poluição dos rios, do ar e do solo. Além disso, ocasionam a contaminação dos alimentos e das cadeias alimentares, gerando malefícios à saúde de organismos superiores, como a do homem.

O morango, pseudofruto da família das rosáceas, largamente produzido e consumido em diferentes partes do mundo, é um dos produtos agrícolas com maior índice de contaminação por agrotóxicos. Segundo dados divulgados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos de Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), das 157 amostras de morango analisadas, 41 apresentaram resíduos de agrotóxicos acima do permitido e 110 exibiram contaminação com produtos não autorizados para a cultura.

Ainda que existam altos índices de utilização de agrotóxicos no cultivo vegetal, a produção livre de resíduos tóxicos e a preocupação da população com os danos ambientais têm crescido nos últimos anos. Por isso, pesquisas vêm sendo realizadas para a obtenção de métodos alternativos de controle de fitopatógenos, como a indução de resistência dos vegetais.

A indução de resistência é um método de controle de doenças de plantas que visa a ativação de mecanismos latentes de defesa vegetal, de forma semelhante ao sistema imunológico dos mamíferos, onde, após o contato com algum agente estranho, o organismo defende-se através da síntese de anticorpos específicos. No caso dos vegetais, não há produção de anticorpos, mas, a exemplo do que ocorre nos animais, a ativação dos mecanismos de defesa latentes é propiciada pela sinalização, ou seja, a partir do reconhecimento do patógeno pela planta. Este processo, mediado por receptores celulares capazes de interagir com elicitores, gera

um sinal que é amplificado para o sítio de ação no interior da célula e que, posteriormente, é traduzido e revertido em ativação de genes envolvidos com a síntese de proteínas relacionadas à patogênese ou com a ativação de mecanismos de defesa estruturais, como dos genes responsáveis pela deposição de calose (1,3 β - glucano) que é acompanhada por posterior lignificação.

Estudos sobre as respostas de defesa ganham cada vez mais atenção na comunidade científica, tendo em vista o potencial prático de aplicação destes conhecimentos no controle de doenças nas culturas. Sabe-se que a exposição a determinadas moléculas elicitoras (bióticas ou abióticas), pode deixar o vegetal em estado de alerta ou ativar seus mecanismos previamente. Desta forma, quando ocorre o contato com o microrganismo, a penetração do fitopatógeno pode ser dificultada e, consequentemente, a redução dos sintomas pode ocorrer. Algumas das substâncias que já foram utilizadas na indução de resistência vegetal são os óleos essenciais e os polissacarídeos.

Os óleos essenciais, compostos naturais produzidos por plantas aromáticas, são metabolitos secundários com potencial, antioxidante, anti-radicalar e, principalmente, antimicrobiano. Devido suas propriedades medicinais, muitos destes compostos aromáticos têm sido amplamente utilizados como ingredientes funcionais em alimentos, cosméticos e medicações. Dentre os óleos essenciais podem-se destacar os de tea tree e palmarosa.

O óleo essencial derivado de *Melaleuca alternifolia*, planta nativa australiana popularmente conhecida como árvore de chá (tea tree) ou melaleuca, é composto de hidrocarbonetos aromáticos voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados. Os primeiros a constatarem a ação benéfica da *M. alternifolia* sobre a saúde humana foram os aborígenas Bundjalung do norte da Nova Gales do Sul. Os nativos inalavam folhas esmagadas da "árvores de chá", para tratar tosse e resfriados, ou aspergiam sobre as feridas, para evitar infecções. A partir do uso tradicional dos aborígenas, estudos passaram a ser realizados para verificar o real potencial desta planta no controle de determinadas patologias.

Desde o início dos anos 90, trabalhos científicos demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo de tea tree contra bactérias e fungos causadores de moléstias humanas, como a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Recentemente a atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral e indutora de resistência contra microrganismos fitopatogênicos

também tem sido demonstrada, como por exemplo, contra *Rhizopus stolonifer*, *Tobacco mosaic virus*, *Botrytis* sp. e *Rhizopus* sp.

Grande parte dos estudos que investigam os mecanismos de ação antimicrobiana do tea tree tem-se centrado quase exclusivamente em *C. albicans*. Por isso, apesar da ação direta já ter sido relatada contra fitopatógenos, pouco se sabe a respeito da atuação do óleo sobre este tipo de microrganismo.

O óleo essencial da planta *Cymbopogon martinii*, popularmente conhecida como palmarosa, é largamente utilizado pela indústria de perfumaria como uma fonte de geraniol, que é um monoterpenóide e um álcool, com um odor muito semelhante ao da rosa. Este odor, apesar de agradável ao olfato humano, é considerado repelente de insetos, como por exemplo, do *Anopheles culicifacies*, mosquito vetor da malária.

O óleo de palmarosa, além de repelente, possui ação antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *Phaeoisariopsis griseola*, porém sua influência sobre fitobactérias e sobre ativação de mecanismos de defesa de plantas ainda não foi estudada. Dentre os componentes bioativos do óleo estão o eugenol, acetyleugenol, isoeugenol, metileugenol, carvacrol, timol, cinamaldeído, acetato de eugenilo, β -cariofileno, 2-heptanona, o salicilato de metilo, α -humuleno, ácido gálico, ácido elágico e ácido oleanólico. O eugenol (88,58%) é o principal constituinte e apresenta propriedades inseticidas importantes.

Além dos óleos essenciais, sabe-se que o uso de polissacarídeos no controle de doenças é uma ótima alternativa ao controle convencional de fitomoléstias, pois os mesmos são abundantes, estão prontamente disponíveis e são obtidos a partir de fontes renováveis como culturas microbianas de cepas selecionadas, algas e plantas, como por exemplo, a babosa (*Aloe barbadensis*).

As folhas da babosa, detentoras de um parênquima de reserva mucilaginoso constituído majoritariamente por polissacarídeos, possuem determinadas moléculas e compostos que podem ser utilizados no controle de doenças. Apesar de existirem muitos estudos com a babosa contra doenças humanas, pouco se encontra a respeito do seu efeito no metabolismo das plantas e na redução de fitopatógenos.

Extratos de plantas, óleos essenciais e polissacarídeos podem ser considerados potenciais agentes controladores de doenças vegetais. No entanto, a utilização de alguns destes produtos pode ser limitada devido à sua baixa solubilidade em água. Para resolver este problema, tem-se utilizado a emulsificação para o preparo de determinadas soluções ou suspensões.

A microemulsificação e a nanoemulsificação são processos que visam à formação de sistemas transparentes ou translúcidos, formados por gotículas com até 500 nm e 100 nm de diâmetro, respectivamente. O pequeno tamanho destas gotículas pode reduzir a degradação química do ingrediente ativo, impedir a floculação dos mesmos e manter o sistema disperso, sem separação. Além disso, a grande área superficial e a deposição uniforme da (micro)nanoemulsão sobre superfícies permitem uma penetração rápida dos agentes ativos presentes.

Geralmente, as nanoemulsões são feitas em geradores de ultrassom ou homogeneizadores de alta pressão. O uso do ultrassom para a preparação de soluções ou suspensões consiste em conduzir o líquido em direção a uma lâmina vibratória. Esta lâmina, por sua vez, produz ondas ultrassônicas que são capazes de exercer um efeito cortante e, consequentemente, de produzir pequenas gotículas.

Tendo em vista as necessidades de busca de novos métodos de controle de doenças de plantas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de óleos essenciais, polissacarídeos e de suas emulsões no controle da mancha angular do morangueiro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de emulsões de óleos essenciais e polissacarídeos no controle da mancha angular do morangueiro (*X. fragariae*) e na ativação de mecanismos de defesa vegetal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanoemulsões a partir de polissacarídeos da babosa (AP) e óleos essenciais de tea tree (T_{AP}) ou palmarosa (P_{AP});
- verificar o efeito das formulações sobre o crescimento *in vitro* da *X. fragariae* e sobre a severidade da mancha angular do morangueiro;
- analisar a atividade de enzimas envolvidas na defesa vegetal em plantas tratadas com AP, T_{AP} e P_{AP} e inoculadas com *X. fragariae*;
- determinar e quantificar os compostos fenólicos presentes em folhas de morangueiro tratados com óleos essenciais e inoculados com o agente causal da mancha angular;
- avaliar parâmetros fisiológicos, como condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética, de morangueiros tratados com AP, T_{AP} ou P_{AP} e desafiados com *X. fragariae*;
- examinar a superfície foliar de morangueiros tratados com AP, T_{AP} ou P_{AP} e inoculados com *X. fragariae*.

CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

1.1. A CULTURA DO MORANGUEIRO

1.1.1. Descrição botânica

No século XIV, espécies selvagens de morango, como a *Fragaria virginiana*, *F. chiloensis* e *F. ovalis* (Lehn) Rydb, procedentes do continente americano, foram introduzidas na Europa e cultivadas em jardins com finalidade ornamental e medicinal. Através da hibridização natural dessas espécies introduzidas, originou-se a *Fragaria ananassa* Duch que, geneticamente, está entre as plantas cultivadas mais complexas, abrigando oito conjuntos de cromossomos ($2n = 8x = 56$) derivados de até quatro diferentes ancestrais diploides (SHULAEV et al., 2011).

O morangueiro cultivado, pertencente à família das rosáceas, é uma planta herbácea de porte rasteiro, com sistema radicular fasciculado e superficial. Seu caule é um rizoma estolhoso, com entre nós curtos, suas folhas são trifoliadas, cada um com seu próprio pecíolo, unidas a um pecíolo principal, e suas flores em geral são hermafroditas (GOMES, 2007).

O morango, pseudofruto não climatério do morangueiro, é constituído por um receptáculo floral hipertrofiado, com coloração vermelha, uma polpa doce, carnosa e suculenta, onde se prendem os frutos verdadeiros, denominados de aquênios. Este pseudofruto destaca-se pelo aspecto atraente e pelo seu sabor diferenciado quando consumido *in natura* ou processado. Devido às suas atratividades, o cultivo do morango tem crescido e tornando-se economicamente importante em variadas regiões do Brasil e do mundo (PALIYATH et al., 2008; SANHUEZA et al., 2005) (PALIYATH et al., 2008; SANHUEZA et al., 2005).

1.1.2. Importância econômica

O morangueiro foi trazido para o Brasil no século XVIII e cultivado em jardins e hortas caseiras, contudo o pseudofruto passou a ser comercializado em meados do século XX (CAMARGO; ALVES; ABRAMIDES, 1963). Atualmente, a planta de morango é uma hortícola de grande importância para a economia brasileira e mundial. Em uma área

aproximada de 240.000 ha, os países produtores, nos últimos 10 anos, colheram em torno de 4.000.000 de toneladas de morango, e aproximadamente 40% desta produção foi obtida de países do continente americano (FAO, 2012). Este pseudofruto pode ser processado e utilizado em geleias, biscoitos, iogurtes, sorvetes, etc., possuindo uma diversidade de opções de processamento e comercialização (SANHUEZA et al., 2005).

O morangueiro, além de produzir satisfatoriamente, destaca-se pela sua capacidade de adaptação em diferentes climas, podendo assim, ser cultivado em várias partes do mundo, incluindo áreas tropicais, subtropicais e temperadas (TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2012).

O Brasil não está entre os principais produtores mundiais de morango (China, Estados Unidos, Turquia, Espanha, Polônia, Coreia do Sul, Rússia, Alemanha, Japão e Itália) (FAOSTAT, 2014). Contudo, devido às condições climáticas do país, que favorecem o cultivo e propiciam uma produção em quase todos os meses do ano, o crescimento da produtividade tem se destacado (MADAIL; REICHERT; MIGLIORINI, 2005). Em 2006, por exemplo, o Brasil produziu cerca de 100 mil toneladas, cultivadas numa área próxima a 3.500 ha.

No Brasil, o cultivo de morangueiro é distribuído nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Distrito Federal. Em Santa Catarina, o morango é cultivado em 95 hectares e sua produção é de 2.455 toneladas (IBGE, 2006). Os principais municípios produtores do estado são: Caçador, Urussanga, Itajaí, Rio do Sul, Florianópolis e Tubarão.

Com relação à importância nutricional do morango, o consumo deste pseudofruto pode suprir a carência de alguns minerais, de vitaminas C e vitaminas do complexo B. Além disso, é considerado uma valiosa fonte de antocianinas (SIMIRGIOTIS et al., 2009).

1.1.3. Mancha angular do morangueiro

A bactéria *X. fragariae* foi descrita pela primeira vez em 1962 na América do Norte. Atualmente, encontra-se largamente distribuída no mundo, em países europeus (França, Espanha, Portugal, Itália, etc), na Ásia (Taiwan), África (Etiópia) e da América do Sul (Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai, Venezuela). No Brasil, esta doença foi relatada em Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (SHEETS; PESTS, 2006).

X. fragariae, agente causal da mancha angular do morangueiro, é uma bactéria, gram-negativa, com tamanho médio de 0,4 x 1,3 µm. A maioria das células são imóveis, mas algumas possuem um único flagelo polar, e sua infecção ocorre por meio de aberturas naturais, como os estômatos. Em meio de cultura, as colônias são circulares, brilhantes, com coloração amarelo-pálido (BRADBURY, 1977).

Nas folhas, os sintomas aparecem como manchas angulares, com 1 a 4 mm, com aspecto brilhante, encharcadas e cercadas pelas menores nervuras. Na fase inicial, visíveis apenas na superfície inferior, os sintomas aparecem como pequenos pontos translúcidos ao serem posicionadas contra a luz. Com o desenvolvimento da doença, as manchas tendem a ampliar e, após duas semanas, são visíveis na superfície superior como manchas angulares embebidas em água, que se tornam marrom-avermelhadas. Na face abaxial da folha, é possível observar exsudado bacteriano que, quando seco, fica com uma coloração marrom. Nos casos mais graves, a coroa pode ser infectada e a doença pode se tornar sistêmica (HILDEBRAND; SCHROTH; WILHELM, 1967; KENNEDY; KING, 1962; MAAS, 1984). As condições que favorecem a infecção são alta umidade relativa e temperatura média de 20 ° C (MAAS, 1984).

A mancha angular pode ser responsável por uma redução significativa na produção do morango. Contudo, mesmo prejudicando o desenvolvimento da planta e sua produtividade, geralmente, a doença não ocasiona a morte vegetal. O uso de mudas sadias e a prevenção de condições que favorecem a doença são os principais métodos de controle. Os tratamentos com agrotóxicos à base de cobre têm alguma eficácia, mas tem de ser aplicado de forma muito intensa, com risco de fitotoxicidade e contaminação do alimento (MAAS, 1984).

1.2. CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

1.2.1. Indução de resistência

Os patógenos de plantas usam diversas estratégias para infectar e colonizar os tecidos vegetais, liberando moléculas efetoras para melhorar a sua aptidão microbiana (JONES; DANGL, 2006). Contudo, durante o processo evolucionário, as plantas desenvolveram mecanismos próprios de defesa para dificultar a colonização dos seus tecidos (WALTERS; NEWTON; LYON, 2005).

As plantas, ao contrário dos mamíferos, não possuem células defensoras móveis e um sistema imunológico adaptativo somático. Em

vez disso, elas contam com a imunidade inata de cada célula, ou seja, com aspectos anatômicos que funcionam como barreiras à penetração do patógeno, e com o reconhecimento do microrganismo pela planta, que leva à ativação de mecanismos de defesa (JONES & DANGL, 2006).

O reconhecimento entre hospedeiro e microrganismo tem um papel fundamental na interação entre plantas e seus agentes patogênicos. Os patógenos, por exemplo, possuem a capacidade de detectar a presença de plantas em seu ambiente e, além disso, são capazes de reconhecer características específicas da superfície do seu hospedeiro, para efeito de penetração e infecção. Em contrapartida, as plantas possuem mecanismos sofisticados para detectar a multiplicidade de agentes patogênicos potenciais em seu ambiente e para ativar sua defesa na presença de determinados microrganismos (BOLLER, 1995; HAHN, 1996).

O reconhecimento de microrganismos pelas plantas ocorre de duas maneiras. A primeira forma é definida como defesa basal, onde um determinado padrão molecular proveniente de microrganismos, como por exemplo, a flagelina bacteriana, é reconhecido por receptores transmembrana logo após o contato com a célula vegetal. A segunda, definida como resistência específica do hospedeiro, é baseada na interação altamente específica entre moléculas efetoras dos patógenos e receptores proteicos ricos em leucina. Estes receptores são codificados por genes de resistência (R) e ficam no interior da célula das plantas. Desta forma, os vegetais podem reconhecer diversas moléculas, denominadas de elicitores, que geram um sinal que é amplificado para o sítio de ação no interior da célula e que, posteriormente, é traduzido e revertido em ativação de genes envolvidos com defesa vegetal (JONES; DANGL, 2006; ZHANG; ZHOU, 2010).

O termo moléculas elicitores, inicialmente, foi utilizado para se referir a moléculas que induzem a síntese e acúmulo de compostos antimicrobianos no interior das células vegetais. Porém, hoje, este é comumente empregado para designar moléculas, de origem biótica ou abiótica, exógeno ou endógena, que estimulam qualquer mecanismo de defesa vegetal. Exemplos de mecanismos induzidos por elicitores incluem a síntese de compostos fenólicos, a síntese de proteínas que inibem a ação de enzimas produzidas por patógenos, a formação de estruturas de defesa histológica, a produção de novas classes de proteínas relacionadas à patogênese e uma resposta de hipersensibilidade, entre outros (DIXON, 1986; HAHN, 1996; KEEN, 1975; STICHER; MAUCH MANI; METRAUX, 1997).

O processo de ativação de mecanismos de defesa, resultante dos estímulos provocados por moléculas elicitoras, é chamado de indução de resistência do vegetal, que pode acontecer tanto no sítio de contato do indutor com a planta, como em locais distantes do mesmo, ou seja, pode acontecer de forma local ou sistêmica. Assim, define-se a indução de resistência como um aumento do nível de resistência, em consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, utilizando-se de agentes externos (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

As alterações na resistência vegetal a agentes patogênicos vêm chamando a atenção da comunidade acadêmica para a investigação de potenciais indutores de resistência, como é o caso de determinados óleos essenciais, extratos de plantas medicinais, polissacarídeos, leveduras, moléculas químicas, entre outros. Além disso, alguns indutores de resistência já foram transformados em produtos, registrados e liberados para uso na agricultura em diferentes países, como por exemplo, Oryzmate®, Bion®, Messenger®, Oxycon® e Elexa®. O Bion ® (Acibenzolar-S-metil) é o único indutor de resistência liberado no Brasil.

Apesar de existirem poucos indutores comerciais disponíveis, estudos sobre indução de resistência vêm sendo realizados há muitos anos. Um dos primeiros trabalhos sobre indução de resistência foi realizado por Chester (1933). O autor demonstrou que plantas inoculadas com microrganismos atenuados ficavam protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo patógeno ou contra outros semelhantes. A partir deste estudo, muitas pesquisas foram e continuam sendo realizadas a respeito do assunto, para uma melhor compreensão das respostas estruturais e bioquímicas da planta na presença de agentes elicitores e para a confirmação da indução de resistência da mesma.

1.2.2. Mecanismos de defesa vegetal

Entre os mecanismos de defesa ativados por elicitores, o mais eficiente é a reação de hipersensibilidade, onde ocorre a morte de células que ficam em contato com o patógeno, evitando o desenvolvimento do microrganismo sobre o tecido vegetal. Durante o processo de ativação deste mecanismo, ocorre a indução da produção de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta, como por exemplo, de proteínas estruturais, de enzimas peroxidases envolvidas na lignificação, de enzimas do metabolismo secundário responsáveis pela biossíntese de compostos antimicrobianos. Além disso, a ativação de mecanismos de defesa pode culminar em alterações na atividade de enzimas, como a

fenilalanina-amônia-liase (FAL) (MASSALA; LEGRAND; FRITTIG, 1980), e no acúmulo de compostos fenólicos (STINTZI et al., 1993).

A FAL é a enzima responsável pela desamidação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos, os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (RITTER; SCHULZ, 2004).

Os fenólicos, produtos do metabolismo secundário, podem ser considerados um dos grupos mais comuns e importantes de substâncias vegetais. Os "compostos fenólicos", "polifenóis" ou "fenólicos" são substâncias que possuem um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxilo, incluindo derivados funcionais, como por exemplo, ésteres, éteres metílicos, glicosídeos, etc. Estes compostos, além de serem oxidados por enzimas, como as peroxidases e polifenoloxidasas, e de contribuírem para a defesa vegetal contra doenças, são importantes para a pigmentação, crescimento e reprodução das plantas (LATTANZIO et al., 2006).

Além do aumento da atividade das enzimas citadas e do aumento do conteúdo total de compostos fenólicos, existem outros mecanismos de defesa que podem ser ativados e que contribuem de forma significativa para a redução de doenças com importância agrônômica. Mudanças fisiológicas, o estresse oxidativo ocorrido nos vegetais na presença de patógenos e a subsequente morte celular, são exemplos destes mecanismos.

1.2.3. Estresse oxidativo nas plantas

As plantas estão constantemente expostas a estresses ambientais, como altas temperaturas, estresse hídrico, ataque de pragas e infecção de microrganismos patogênicos. Esta exposição vegetal ao estresse, por sua vez, é capaz de alterar o metabolismo e de gerar uma variedade de respostas a nível molecular e celular (ZHU, 2002). Uma das alterações metabólicas importantes é o aumento de espécies ativas de oxigênio, que em condições normais de crescimento e desenvolvimento vegetal, mantem-se em níveis reduzidos (MEHDY, 1994).

Geradas em baixos níveis por células vegetais durante o transporte de elétrons nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias, as espécies ativas de oxigênio são resultado da excitação no elétron externo do O₂, formando oxigênio simples (¹O₂), ou de uma sucessiva adição de elétrons, produzindo o superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical

hidroxila (OH). Estas moléculas, consideradas tóxicas às células vegetais, são denominadas ativas, pois não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas (MEHDY, 1994).

Apesar de gerar danos celulares, afetando processos metabólicos, como a fotossíntese, respiração e fixação de CO₂, as espécies ativas de oxigênio podem ser benéficas às plantas em determinadas concentrações. A produção de H₂O₂, por exemplo, fortalece a parede das células vegetais, prevenindo a penetração de microrganismos patogênicos, e atuando como um sinalizador e ativador de determinados mecanismos de defesa (MEHDY, 1994; MITTLER, 2002).

Devido aos possíveis danos celulares que o estresse oxidativo pode causar, as espécies ativas de oxigênio são eliminadas através de sistemas antioxidantes regulados pela concentração de oxigênio molecular (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

O sistema enzimático das plantas, além de proteger as células contra o estresse oxidativo, desempenha um papel fundamental na defesa vegetal contra microrganismos patogênicos. A defesa acontece, pois, proteínas antioxidantes como as polifenoloxidasas e ascorbato peroxidase levam à formação de compostos antimicrobianos que atuam diretamente sobre o patógeno (GULSEN et al., 2010). Além disso, as enzimas ajudam o vegetal a manter a viabilidade de suas células e impedem o estabelecimento de patógenos necrotróficos, como por exemplo, da *Sclerotinia sclerotiorum* (PELUFFO et al., 2010).

1.2.4. Enzimas antioxidantes

As superóxido-dismutases, proteínas pertencentes ao grupo de metalo-enzimas, ocorrem no citossol, cloroplastos e mitocôndrias vegetais, são responsáveis pela catálise da dismutação do O₂⁻ a peróxido de hidrogênio (SCANDALIOS, 1993; VAN BREUSEGEM et al., 2001). Estas enzimas são consideradas importantes antioxidantes, porém, em concentrações elevadas, podem contribuir com a morte celular programada (BAKER, C.J.; ORLANDI, 1995), que muitas vezes impedem o desenvolvimento de patógenos biotróficos.

As catalases são enzimas que convertem o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água. Em tecidos vegetais infectados por microrganismos, uma redução da atividade da catalase pode levar a um aumento de peróxido de hidrogênio, e consequentemente, à morte celular, o que caracteriza a reação de hipersensibilidade, umas das mais eficientes respostas de defesa vegetal (MAGBANUA et al., 2007).

Guaiacol peroxidases, proteína diretamente relacionada com a oxidação de determinados compostos orgânicos, é uma enzima chave no controle da diferenciação, desenvolvimento e crescimento das plantas. Além disso, a guaiacol peroxidase, atua na defesa vegetal contra danos e infecções de microrganismos fitopatogênicos (TZIKA et al., 2009), pois estão associadas ao fortalecimento da parede celular (SARAIVA; NUNES; COIMBRA, 2007).

A expressão das enzimas antioxidantes, como a guaiacol peroxidase, catalases e entre outras, que atuam sobre as espécies ativas de oxigênio, pode estar diretamente envolvida em processos relacionados à indução de resistência vegetal, como a reação de hipersensibilidade, a produção de flavonoides e outros compostos fenólicos. Dentre as moléculas envolvidas na promoção da expressão de genes de defesa, estão os polissacarídeos e os óleos essenciais.

1.2.5. Polissacarídeos no controle de doenças de plantas

Os polissacarídeos são considerados uma classe bem caracterizadas de elicitores, que podem induzir respostas de defesa em vegetais contra patógenos até mesmo em concentrações muito baixas, na ordem de nmol.l^{-1} . Devido à natureza química e também à alta percepção destas moléculas pelas plantas, alguns polissacarídeos têm sido utilizados como modelos para estudos relacionados à indução de resistência (NURNBERGER et al., 2004). Além disso, a aplicação de polissacarídeos pode representar uma alternativa ao controle convencional de fitomoléstias, pois os mesmos são abundantes, prontamente disponíveis e podem ser obtidos a partir de fontes renováveis (LUIZ et al., 2012).

Diversos sacarídeos (poli, oligo ou mono), com características elicitoras e capazes de reduzir a severidade de doenças vegetais, têm sido descritos na literatura. Dentre esses, pode-se destacar as quitinas (WAN; ZHANG; STACEY, 2008), as quitosanas (COQUEIRO; MARASCHIN; PIERO, 2011) e os lipo ou exo polissacarídeos presentes em bactérias (LUIZ et al., 2016). Além dos mencionados anteriormente, também tem sido observado a capacidade de polissacarídeos presentes em vegetais, como a *Aloe barbadensis*, de ativar mecanismos de defesa e controlar doenças vegetais (LUIZ et al., 2016; LUIZ; ROCHA NETO; DI PIERO, 2015).

Jasso de Rodríguez et al. (2005) comprovaram a capacidade das frações líquidas de folhas de babosa de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum coccodes* da

batata. Em estudo semelhante, Casian et al. (2007) demonstraram o efeito fungicida da babosa contra *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium oxysporum*, *Heterosporium pruneti* e *Penicillium gladioli*. Luiz et al. (2012) e Luiz; Rocha Neto; Di Piero (2015), não observaram um efeito antimicrobiano da babosa sobre bactérias, porém demonstraram a redução da mancha bacteriana (*X. gardneri*) e o aumento da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e glucanases em tomateiros (cv. Santa Cruz Kada) tratados com suspensão de polissacarídeos da planta (1,5 mg.mL⁻¹). Trabalhos como estes demonstram o potencial da babosa e seus polissacarídeos no controle de doenças de importância econômica.

Além dos polissacarídeos já mencionados, também tem sido observado o potencial de óleos essenciais de controlar doenças vegetais. De acordo com Schwan-Estrada; Stangarlin, (2005), a exploração da atividade biológica de metabólitos secundários, presentes no extrato bruto ou em óleos essenciais de plantas medicinais, pode representar mais uma forma potencial de controle alternativo de doenças vegetais.

1.2.6. Óleos essenciais no controle de doenças de plantas

Os óleos essenciais, compostos naturais produzidos por plantas aromáticas, são metabólitos secundários com potencial antioxidante (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013), anti-radicalar (PAVLOVIĆ et al., 2011) e antimicrobiano (PRASHAR et al., 2003). Devido suas propriedades medicinais, muitos destes compostos aromáticos têm sido amplamente utilizados como ingredientes funcionais em alimentos, cosméticos e medicações (BURT, 2004). Dentre os óleos essenciais podem-se destacar os óleos de tea tree e palmarosa.

O óleo essencial derivado de *Melaleuca alternifolia*, planta nativa australiana popularmente conhecida como árvore de chá (tea tree) ou melaleuca, é composto de hidrocarbonetos aromáticos voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Devido às suas propriedades antimicrobianas, este produto extraído de vegetais, é largamente utilizado na produção de cosméticos e medicamentos.

Os primeiros a constatarem a ação benéfica da *M. alternifolia* sobre a saúde humana foram os aborígenas Bundjalung do norte da Nova Gales do Sul. Os nativos inalavam folhas esmagadas da "árvores de chá", para tratar tosse e resfriados, ou aspergiam sobre as feridas, para evitar infecções. A partir do uso tradicional dos aborígenas, estudos passaram a

ser realizados para verificar o real potencial desta planta no controle de determinadas patologias (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Desde o início dos anos 90, trabalhos científicos demonstraram a atividade antimicrobiana do tea tree contra bactérias e fungos causadores de moléstias humanas, como a *Staphylococcus aureus* (CARSON; MEE; RILEY, 2002) e *Candida albicans* (HAMMER; CARSON; RILEY, 2004). A atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral contra microrganismos fitopatogênicos também já foi relatada, como por exemplo, contra *Rhizopus stolonifer* (SHAO et al., 2013), *Xanthomonas vesicatoria* (LUCAS et al., 2012) e *Tobacco mosaic virus* (BISHOP, 1995).

Grande parte dos estudos que investigam os mecanismos de ação antimicrobiana da *Melaleuca alternifolia* tem-se centrado quase exclusivamente em *C. albicans* (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). Por isso, apesar da ação direta já ter sido relatada contra fitopatógenos, pouco se sabe a respeito da atuação do óleo sobre este tipo de microrganismo.

O óleo essencial da planta *Cymbopogon martinii*, popularmente conhecida como palmarosa, é largamente utilizado pela indústria de perfumaria como uma fonte de geraniol (MALLAVARAPU et al., 1998), que é um monoterpênóide e um álcool, com um odor muito semelhante ao da rosa. Este odor, apesar de agradável ao olfato humano, é considerado repelente de insetos, como por exemplo, do *Anopheles culicifacies*, mosquito vetor da malária (ANSARI; RAZDAN, 1995). O óleo de palmarosa, além de repelente, possui ação antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* (DELESPAUL et al., 2000) e *Phaeoisariopsis griseola* (HOYOS et al., 2012), porém sua influência sobre fitobactérias e sobre ativação de mecanismos de defesa de plantas ainda não foi estudado.

1.3. NANOEMULSÕES

Extratos de plantas, óleos essenciais e polissacarídeos podem ser considerados potenciais agentes controladores de doenças vegetais. No entanto, a utilização de alguns destes produtos pode ser limitada devido à sua baixa solubilidade em água. Para resolver este problema, tem-se utilizado a micro ou nanoemulsificação para o preparo de determinadas soluções ou suspensões.

De acordo com a Comissão Europeia (2011) a microemulsificação é um processo que visa a formação de sistemas transparentes ou

translúcidos com gotículas com até 500 nm de diâmetro. Dispersões com gotículas com até 100 nm são consideradas nanoemulsões (TRADOS et al., 2004). O pequeno tamanho destas gotículas pode reduzir a degradação química do ingrediente ativo (MCCLEMENTS; DECKER, 2000), impedir a floculação dos mesmos e manter o sistema disperso, sem separação. Além disso, a grande área superficial e a deposição uniforme da (micro)nanoemulsão sobre superfícies permitem uma penetração rápida dos agentes ativos presentes (TADROS et al., 2004).

Geralmente, as emulsões são feitas em geradores de ultrassom ou homogeneizadores de alta pressão. O uso do ultrassom para a preparação de soluções ou suspensões consiste em conduzir o fluido através de um orifício de diâmetro reduzido, com pressão moderada, e orientado em direção a uma lâmina vibratória. Quando o sistema atinge uma fase estacionária, entra em cavitação, próximo à extremidade da lâmina. A consequente vibração desta lâmina, por sua vez, produz ondas ultrassônicas que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de tamanho reduzido (TRADOS et al., 2004).

Os homogeneizadores de alta pressão são equipamentos utilizados na produção de nanoemulsões (TRADOS et al., 2004). Para a formação das soluções ou suspensões nanoemulsificadas, o fluido entra na sede da válvula, que é fechada por um êmbolo e por um pistão hidráulico. A pressão exercida pelo fluido gera um recuo milimétrico entre a válvula e o êmbolo. Através da folga formada, o fluido sai a uma velocidade elevada, colidindo com um amortecedor de impacto, que fica em volta da válvula. Através da queda brusca de pressão e do impacto gerado, as partículas sólidas suspensas, como os polissacarídeos, ou os líquidos, como os óleos essenciais, se fracionam em partículas extremamente pequenas.

No caso dos óleos essenciais, equipamentos como o ultrassom e homogeneizadores geram uma perturbação e transformam as fases oleosa e aquosa em pequenas gotículas de óleo dispersas em água (DATE et al., 2010; TADROS et al., 2004). Esta formação, por sua vez, pode facilitar a aplicação de óleos sobre superfícies (TRADOS et al., 2004) e, além disso, pode favorecer o potencial antibacteriano (ANWER et al., 2014), antifúngico e inseticida (SUGUMAR et al., 2014) das emulsões.

Apesar de existirem muitos estudos a respeito do efeito da fina dispersão de óleos essenciais e polissacarídeos contra agentes patogênicos humanos, pouco se sabe sobre a ação das nanoemulsões contra doenças de plantas. Dentre os estudos desenvolvidos, pode-se destacar o efetuado por Zahid et al. (2012). Neste trabalho, os pesquisadores verificaram que

microemulsões de quitosana, com gotículas de 200 nm e 600 nm, protegeram frutas de banananeira, mamoeiro e fruta-dragão contra antracnose (*Colletotrichum* spp.) sob armazenamento refrigerado.

REFERÊNCIAS

- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.
- ANSARI, M. A.; RAZDAN, R. K. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. **Indian journal of malariology**, v. 32, p. 104–111, 1995.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008.
- ANWER, M. K. et al. Enhanced antibacterial effects of clove essential oil by nanoemulsion. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 4, p. 347–54, 2014.
- BAKER, C.J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 299–321, 1995.
- BISHOP, C. D. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. **Journal essential oil research**, v. 7, p. 641–644, 1995.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179–194, 2003.
- BOLLER, T. Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 1, p. 189–214, 1995.
- BRADBURY, J. *Xanthomonas fragariae*. In: **Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 558, CAB International, Wallingford, 1977.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CASIAN, R. O. . et al. Antifungal activity of Aloe vera leaves. **Fitoterapia**, v. 78, p. 219–222, 2007.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Review of Biology**, v. 8, p. 275–324, 1933.

COQUEIRO, D. S. O.; MARASCHIN, M.; PIERO, R. M. DI. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7–8, p. 488–494, 2011.

DATE, A. A. et al. Selfnanoemulsifying drug delivery systems: Formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, v. 5, p. 1595–1616, 2010.

DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 256–266, 2000.

DIXON, R. . The phytoalexin response: elicitation, signalling and control of host gene expression. **Biological Reviews**, v. 61, p. 239–291, 1986.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

GOMES, P. **Fruticultura brasileira**. 13. ed. São Paulo: [s.n.].

GULSEN, O. . et al. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*.

Arthropod Plant Interact, v. 4, p. 45–55, 2010.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 30, p. 387–412, 1996.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 1081–1085, 2004.

HILDEBRAND, D. C.; SCHROTH, M. N.; WILHELM, S. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. **Phytopathology**, v. 57, p. 1260, 1967.

HOYOS, J. M. A. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270–284, 2012.

IBGE. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KEEN, N. T. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? **Science**, v. 187, p. 74–75, 1975.

KENNEDY, B. W. ; KING, T. H. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. **Phytopathology**, v. 52, p. 873–875, 1962.

LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry**, v. 661, n. 2, p. 23–67, 2006.

LUCAS, G. C. et al. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 351–359, 2012.

LUIZ, C. et al. Protection of tomato by polysaccharides from *Aloe*

barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 387–393, 2012.

LUIZ, C. et al. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170–177, 2016.

LUIZ, C.; ROCHA NETO, A. C.; DI PIERO, R. M. Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 1, p. 119–127, 2015.

MAAS, J. L. **Compendium of strawberry diseases**. St. Paul, Minnesota, USA.: American Phytopathology Society, 1984.

MADAIL, J. C. M.; REICHERT, L. R.; MIGLIORINI, L. C. **Sistema de Produção**. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

MAGBANUA, Z. V. . et al. Is Catalase Activity One of the Factors Associated with Maize Resistance to *Aspergillus flavus*?. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 697–70, 2007.

MALLAVARAPU, G. R. et al. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 167–169, 1998.

MASSALA, R.; LEGRAND, M.; FRITTIG, B. Effect of α-aminoxyacetate, a competitive inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. **Physiol Plant Pathol**, v. 16, p. 213–226, 1980.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal Food Science**, v. 65, p. 1270–1282, 2000.

MEHDY, M. C. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. **Plant physiology**, v. 105, n. 2, p. 467–472, 1994.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

PALIYATH, G. et al. **Postharvest Biology and Technology of Fruit, Vegetables and Flowers**. 1. ed, Wiley-Blackwell, Ames, 497 p., 2008 .

PAVLOVIĆ, I. et al. Corrigendum to composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae) essential oil. **Food Chemistry**, v. 130, p. 310–315, 2011.

PELUFFO, L. . et al. Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Phytochemistry**, v. 71, p. 70–80, 2010.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569–575, 2003.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant cell**, v. 16, n. 12, p. 3426–3436, 2004.

SANHUEZA, R. M. . et al. **Sistema de produção EMBRAPA**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

SARAIVA, J. A.; NUNES, C. S.; COIMBRA, M. A. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase- Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1571–1579, 2007.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. **Plant physiology**, v. 101, n. 1, p. 7–12, 1993.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. .; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: FEALQ (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; et al., p. 125–132, 2005.

SHAO, X. et al. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 94–101, 2013.

SHEETS, D.; PESTS, Q. *Xanthomonas fragariae*. **EPPO Bulletin**, v. 36, n. 1, p. 135–144, 2006.

SHULAEV, V. et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 109–116, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 377–385, 2009.

STADNIK, M. J. .; MARASCHIN, M. Inducao de resistencia de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). . **Manejo ecológico de doenças de plantas**. 1. ed. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 221–244.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235–270, 1997.

STINTZI, A. et al. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, n. 8, p. 687–706, 1993.

SUGUMAR, S. et al. Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 104, n. 3, p. 393–402, 2014.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TZIKA, E. D. . et al. Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. Koroneiki). **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 487–495, 2009.

VAN BREUSEGEM, F. . et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405–414, 2001.

WALTERS, D. R.; NEWTON, A. C.; LYON, G. D. Induced resistance: Helping plants to help themselves. **Biologist**, v. 52, p. 28–33, 2005.

WAN, J.; ZHANG, X.; STACEY, G. Chitin signaling and plant disease resistance and es io. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 10, p. 831–833, 2008.

ZAHID, N. et al. Potential of chitosan-loaded nanoemulsions to control different Colletotrichum spp. and maintain quality of tropical fruits during cold storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 925–939, 2012.

ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**, v. 3, n. 5, p. 783–793, 2010.

ZHU, J. K. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Annual Review Plant Biology**, v. 53, p. 247–273, 2002.

CAPÍTULO II – EMULSIONS OF ESSENTIAL OILS AND ALOE POLYSACCHARIDES: ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND RESISTANCE INDUCER POTENTIAL AGAINST *Xanthomonas fragariae*

Publicado na revista Tropical Plant Pathology
DOI: 10.1007/s40858-017-0153-5

Caroline Luiz^{1,2}, Argus Cezar da Rocha Neto¹, Pedro Ometto Franco¹, Robson Marcelo Di Piero^{1,3}. ¹Federal University of Santa Catarina, Agricultural Science Center, 88.034-001, Florianópolis, SC, Brazil. ²caroline_luiz@yahoo.com.br; ³robson.piero@ufsc.br

ABSTRACT

Bacterial angular leaf spot disease (*Xanthomonas fragariae*) is responsible for reduction in strawberry production. We evaluated the effectiveness of emulsions containing tea tree or palmarosa essential oils (EO) against angular leaf spot, seeking to elucidate their action mode in strawberry plants of two cultivars (Albion and San Andreas). For that, tea tree or palmarosa EO were added in an aqueous suspension of aloe polysaccharide (AP). As result, tea tree EO emulsion (T_{AP}) and palmarosa EO microemulsion (P_{AP}) were obtained. Assays to verify the antimicrobial potential of AP, T_{AP} and P_{AP} were conducted. The ability of these preparations to reduce disease severity and to activate plant defenses were evaluated. AP, T_{AP} and P_{AP} reduced the *X. fragariae* growth by up 44.0%, 94.4% and 86.1%, respectively. In addition, T_{AP} and P_{AP} reduced over 100% of disease symptoms in the two cultivars. An increased superoxide dismutase, dismutase, catalase and peroxidase activities were observed in the more susceptible cultivar (Albion) treated with the emulsions, while a higher concentration of total phenolic compounds was verified in the less susceptible cultivar (San Andreas). Thus, emulsions with EO and AP can be used to control angular leaf spot by activating latent defense mechanisms in strawberry.

Keywords: Alternative Control; Angular leaf spot; Tea Tree; Palmarosa; *Aloe barbadensis*; Antioxidant enzymes activity.

REFERENCES

- Allan A, Fluhr R (1997) Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell* 9:1559–1572. doi: 10.1105/tpc.9.9.1559
- Anton N, Benoit JP, Saulnier P (2008) Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Control Release* 128:185–199. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.02.007
- Bajpai VK, Kang S, Xu H, et al (2011) Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A review. *Plant Pathol J* 27:207–224. doi: 10.5423/PPJ.2011.27.3.207
- Boller T (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46:189–214. doi: 10.1146/annurev.pp.46.060195.001201
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Cavalcanti FR, Resende ML V, Carvalho CPS, et al (2007) An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop Prot* 26:729–738. doi: 10.1016/j.cropro.2006.06.012
- Cavalcanti FR, Resende ML V, Lima JPMS, et al (2006) Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pretreated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:198–208. doi: 10.1016/j.pmpp.2006.11.001
- Cheng-Pei C, Be J. W, Yih Ming W (2010) Physiochemical and antimicrobial properties of edible aloe/gelatin composite films. *Int J Food Sci Technol* 45:1050–1055. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02235.x
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR (2015)

- Priming for Enhanced Defense. *Annu Rev Phytopathol* 53:97–119. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120132
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42:185–209. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- Falcón AB, Cabrera JC, Costales D, et al (2008) The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:103–112. doi: 10.1007/s11274-007-9445-0
- Felipini RB, Luiz C, Costa MEB, Di Piero RM (2015) Mode of action of chitosan and ASM for the control of *Cercospora* leaf spot on table beet. *Trop Plant Pathol*. doi: 10.1007/s40858-015-0029-5
- Femenia A, Sánchez ES, Simal S, Rosselló C (1999) Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr Polym* 39:109–117. doi: 10.1016/S0144-8617(98)00163-5
- Ferreira DF (2003) SISVAR v. 4.3 (Build 45).
- GASPAR TH., PENEL CL., THORPE T., GREPPIN H (1982) Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève, Genève
- Giannopolitis CN, Ries SK (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44:147–159. doi: 10.1146/annurev.bi.44.070175.001051
- Gyorgyi Horváth G, Szabo LG, Lemberkovics E, et al (2004) Characterization and TLC-bioautographic detection of essential oils from some Thymus taxa. Determination of the activity of the oils and their components against plant pathogenic bacteria. *J Planar Chromatogr* 17:300–304.
- Hahn MG (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34:387–412. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.387
- Hoyos JMÁ, Alves E, Rozwalka LC, et al (2012) Antifungal activity and

- ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia* 36:270–284. doi: 10.1590/S1413-70542012000300002
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Karlund A, Salminen JP, Koskinen P, et al (2014) Polyphenols in strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves induced by plant activators. *J Agric Food Chem* 62:4592–4600. doi: 10.1021/jf405589f
- Kennedy BW., King TH (1962) Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. *Phytopathology* 52:873–875.
- Kim M-S, Jin JS, Kwak Y-S, Hwang G-S (2016) Metabolic response of strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves exposed to the Angular leaf spot bacterium (*Xanthomonas fragariae*). *J Agric Food Chem* acs.jafc.5b05201. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05201
- Lucas GC, Alves E, Pereira RB, et al (2012) Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesqui Agropecuária Bras* 47:351–359. doi: 10.1590/S0100-204X2012000300006
- Luiz C, Felipini RB, Costa MB, Di Piero RM (2012) Protection of tomato by polysaccharides from aloe barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. *J Plant Pathol* 94:387–393.
- Luiz C, Rocha Neto AC, Di Piero RM (2015) Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. *J Plant Pathol* 97:119–127.
- Luiz C, Schauffler GP, Lemos-Blainski JM, et al (2016) Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. *Sci Hortic (Amsterdam)* 200:170–177. doi: 10.1016/j.scienta.2016.01.025
- Ma Y, Walker RK, Zhao YC, Berkowitz G a (2012) Linking ligand

- perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca^{2+} elevation and downstream immune signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19852–19857. doi: 10.1073/pnas.1205448109
- Maas JL (1984) Compendium of strawberry diseases. American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- McCue P, Zheng Z, Pinkham JL, Shetty K (2000) A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. *Process Biochem* 35:603–613. doi: 10.1016/S0032-9592(99)00111-9
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mur L a J, Simpson C, Gay a., et al (2013) Stomatal lock-up following pathogenic challenge: Source or symptom of costs of resistance in crops? *Plant Pathol* 62:72–82. doi: 10.1111/ppa.12174
- Niranjan Raj S, Lavanya SN, Amruthesh KN, et al (2012) Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biol Control*. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.011
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249–266.
- Paret ML, Cabos R, Kratky BA, Alvarez AM (2010) Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. *Plant Dis* 94:521–527. doi: 10.1094/PDIS-94-5-0521
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant Anna R, et al (1999) Aluminum Effects on Lipid Peroxidation and on the Activities of Enzymes of Oxidative Metabolism in Sorghum 1. *Rev Bras Fisiol Veg* 11:137–143.
- Phimchan P, Chanthai S, Bosland PW, Techawongstien S (2014) Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in

Capsicum under drought stress. J Agric Food Chem 62:7057–7062. doi: 10.1021/jf4051717

Pottier AT de S, Gomes CAO, Jorge DM, et al (2012) Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>.

Rahn-Chique K, Puertas AM, Romero-Cano MS, et al (2012) Nanoemulsion stability: Experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. Adv Colloid Interface Sci 178:1–20. doi: 10.1016/j.cis.2012.05.001

Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. Plant Cell 16:3426–3436. doi: 10.1105/tpc.104.025288

Shao X, Wang H, Xu F, Cheng S (2013) Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. Postharvest Biol Technol 77:94–101. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.11.010

Sheets D, Pests Q (2006) *Xanthomonas fragariae*. EPPO Bull 36:135–144. doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00926.x

Sikkema J, de Bont J a, Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 59:201–222.

Statsoft (2007) STATISTICA 8.0. 339–341.

Sutherland M (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. Physiol Mol Plant Pathol 39:79–93.

Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. Adv Colloid Interface Sci 108–109:303–318. doi: 10.1016/j.cis.2003.10.023

Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR (2003) QUANT: A software plant disease severity assessment. 105.

- Valverde JM, Valero D, Martínez-Romero D, et al (2005) Novel Edible Coating Based on *Aloe vera* Gel To Maintain Table Grape Quality and Safety. *J ofAgricutural food Chem* 53:7807–7813.
- Vergnes S, Ladouce N, Fournier S, et al (2014) Foliar treatments with *Gaultheria procumbens* essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 5:1–8. doi: 10.3389/fpls.2014.00477
- Wang L, Liu F, Jiang Y, et al (2011) Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *J Agric Food Chem* 59:12411–12419. doi: 10.1021/jf203165k
- Wang SY (1999) Methyl Jasmonate Reduces Water Stress in Strawberry. *J Plant Growth Regul* 18:127–134. doi: 10.1007/PL00007060
- Winter CK, Davis SF (2006) Organic foods. *J Food Sci.* doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00196.x

CAPÍTULO III - ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia* E *Cymbopogon martinii* NO METABOLISMO DE FENÓLICOS DE MORANGUEIRO CONTRA A MANCHA ANGULAR (*Xanthomonas fragariae*)

Luiz, C.^{1,2}; Di Piero, R.M.¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88.034-001, Florianópolis, SC, Brasil. ²caroline_luiz@yahoo.com.br

RESUMO

Os fenólicos são uma importante classe de metabólitos secundários envolvidos na defesa vegetal. Objetivou-se avaliar a capacidade da *Melaleuca alternifolia* (tea tree) ou *Cymbopogon martinii* (palmarosa) de induzir resistência em morangueiros contra a mancha angular (*X. fragariae*) e de promover o acúmulo de fenólicos e alterações fisiológicas nas folhas em resposta ao agente patogênico. Suspensão polissacarídica da babosa (AP), nanoemulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) e emulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}) foram pulverizadas sobre plantas de morango. Após 4 dias os morangueiros foram inoculados (*X. fragariae*). Na cv. Albion, AP reduziu cerca de 90% a severidade da mancha, enquanto T_{AP} e P_{AP}, em média, diminuíram 98,8%. Na cv. San Andrea, AP, T_{AP} e P_{AP}, em média, promoveram um decréscimo de 97% dos sintomas. De um modo geral, observou-se que a cultivar Albion possui uma menor concentração de compostos fenólicos do que a San Andreas. Nos extratos foliares de morangueiro foram identificados 7 ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido siríngico, epigallocatequina galato e ácido salicílico). Plantas inoculadas da cv. Albion, tratadas com AP e P_{AP}, apresentaram acúmulo de lignina. Verificou-se a formação de um biofilme bacteriano nas testemunhas, o qual não foi verificado ou observado em baixa quantidade na superfície foliar das plantas previamente tratadas com T_{AP} ou AP, respectivamente. Acredita-se que os óleos essenciais possam ser uma alternativa eficiente para o controle da mancha angular, pois reduzem a severidade da doença e promovem acúmulos de fenólicos sobre as folhas.

Palavras-chave: Emulsão; Palmarosa; Tea tree; Indução de resistência; Controle alternativo.

3.1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são uma grande classe de compostos secundários que constituem um dos grupos mais comuns e generalizados de substâncias em plantas. De acordo com Harborne (1989), os "fenólicos" ou "polifenóis" podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático, com um (fenol) ou mais (polifenol) substituintes hidroxilo, incluindo derivados funcionais (ésteres, éteres metílicos, glicosídeos, etc). Estes compostos, além de serem importantes para a pigmentação, crescimento e reprodução, podem ser oxidados e contribuir para a defesa vegetal contra doenças (LATTANZIO et al., 2006).

Os fenóis fazem parte da defesa constitutiva da planta, ou seja, sua presença é característica intrínseca nas espécies vegetais. Porém, muitas vezes, após um estresse biótico (insetos, bactérias, fungos e nematoides) ou abiótico (temperatura, estresse hídrico, vento, etc.), ocorre o aumento, redução ou síntese de compostos desta natureza no interior e/ou superfície vegetal (KARLUND et al., 2014; LATOUCHE et al., 2013; LATTANZIO et al., 2006).

As alterações vegetais defensivas ocorrem para evitar o desenvolvimento de doenças. Contudo, estas ativações e modificações só acontecem mediante o reconhecimento do patógeno pela planta. Caso contrário, os mecanismos de defesa latentes não são ativados e a defesa constitutiva passa ser a única atuante sobre o microrganismo patogênico (JONES; DANGL, 2006). Apesar desta condição, existem métodos de controle de doenças que visam a aplicação de moléculas elicitoras sobre as plantas (VAN LOON, 1997; VERGNES et al., 2014; WALTERS; NEWTON; LYON, 2005). Estas moléculas, por sua vez, são reconhecidas como agentes agressores e são capazes de promover a resistência contra patógenos através do aumento da concentração de compostos fenólicos.

O processo de ativação de mecanismos de defesa, resultante dos estímulos provocados por moléculas elicitoras, é chamado de indução de resistência do vegetal, que pode acontecer tanto no sítio de contato do indutor com a planta, como em locais distantes do mesmo, ou seja, pode acontecer de forma local ou sistêmica. Assim, define-se a indução de resistência como um aumento do nível de resistência, em consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, utilizando-se de agentes externos (LUIZ et al., 2016; STADNIK; MARASCHIN, 2004; WALTERS; NEWTON; LYON, 2005).

A indução de resistência é uma das medidas promissoras para o controle de doenças vegetais, pois, através de moléculas elicitoras, mecanismos de defesa são ativados sem qualquer alteração no genoma da planta (STADNIK; MARASCHIN, 2004). Além disso, a aplicação de indutores permite com que o vegetal fique em um estado de *Priming*, ou seja, em um estado de “pré-condicionamento” ou de “alerta”, onde somente após o contato com o fitopatógeno ocorrerá a efetiva ativação da defesa latente do vegetal e o consequente gasto energético (CONRATH et al., 2015).

A indução dos mecanismos de defesa requer alocação de recursos internos da planta. A biossíntese de compostos fenólicos, por exemplo, exige energia, esqueletos de carbono e investimento de nutrientes, como o nitrogênio, que são desviados do metabolismo primário (HERMS; MATTSON, 1992). Por isso, em conjunto com as alterações na concentração destes compostos, mudanças fisiológicas, como por exemplo na taxa fotossintética e concentração de clorofila, podem acontecer.

Para patógenos de difícil controle, como por exemplo, a *Xanthomonas fragariae* no morangueiro, a indução de resistência pode ser uma alternativa aos métodos de baixa eficiência atualmente empregados (LUIZ et al., 2017). Luiz et al. (2017) afirmam que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* ou *Cymbopogon martinii* e polissacarídeos de folhas de babosa são capazes de promover o aumento da atividade de enzimas oxidativas e da fenilalanina-amônia-liase (FAL), em morangueiros da cultivar Albion, em resposta ao agente causal da mancha angular (*X. fragariae*).

Os óleos essenciais, como o de *M. alternifolia*, além de possuírem potencial antimicrobiano, podem ser utilizados como moléculas indutoras de resistência, aumentando a atividade de proteínas envolvidas na defesa vegetal e intensificando a atividade de enzimas da rota dos fenilpropanóides, como por exemplo, a FAL (SHAO et al., 2013). A via fenilpropanóide é importante no metabolismo secundário de plantas e produz uma variedade de fenólicos com funções estruturais e de defesa, incluindo ligninas, ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides (DIXON et al., 2002).

O óleo essencial da planta *Cymbopogon martinii*, popularmente conhecida como palmarosa, é largamente utilizado pela indústria de perfumaria como uma fonte de geraniol (MALLAVARAPU et al., 1998), que é um monoterpenóide e um álcool, com um odor muito semelhante ao da rosa. Este odor, apesar de agradável ao olfato humano, é

considerado repelente de insetos (ANSARI; RAZDAN, 1995). O óleo de palmarosa, além de repelente, possui ação antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* (DELESPAUL et al., 2000) e *Phaeoisariopsis griseola* (HOYOS et al., 2012), porém sua influência sobre fitobactérias e sobre ativação de mecanismos de defesa de plantas ainda foi pouco estudado.

A babosa é uma planta com inúmeras propriedades medicinais e pode ser considerada uma rica fonte de polissacarídeos. Diversos sacarídeos (poli, oligo ou mono), com características elicitoras e capazes de reduzir a severidade de doenças vegetais, têm sido descritos na literatura. Dentre esses, pode-se destacar as quitinas (WAN; ZHANG; STACEY, 2008), as quitosanas (COQUEIRO; MARASCHIN; PIERO, 2011) e os lipo ou exo polissacarídeos presentes em bactérias (LUIZ et al., 2016). A aplicação de polissacarídeos presentes na babosa para a redução de doenças vegetais foi pouco estudada. Contudo existem alguns trabalhos que demonstram seu potencial indutor de resistência (LUIZ et al., 2012, 2016; LUIZ; ROCHA NETO; DI PIERO, 2015)

Tendo em vista o potencial antimicrobiano e indutor de resistência de moléculas provenientes de plantas, o presente trabalho buscou estudar a participação do metabolismo de fenólicos e as alterações fisiológicas durante a indução de resistência do morangueiro contra *X. fragariae*, utilizando a suspensão polissacarídica da babosa, emulsão de óleo de tea tree e nanoemulsão de palmarosa como agentes elicitores.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal e microbiano

As cultivares de morangueiro, San Andreas e Albion, foram importadas da Argentina através da empresa Patagonia Agrícola S.A. CUIT. As mudas foram transplantadas em vasos plásticos contendo substrato (casca de pinus, turfa e vermiculita expandida, enriquecido com macro e micronutrientes), conforme o descrito por Luiz et al. (2017).

Para a inoculação das plantas de morango com o agente causal da mancha angular, utilizou-se um isolado de referência de *Xanthomonas fragariae*. A bactéria (código 1371; isolado de *Fragaria ananassa*, 1960, USA; ATCC 33239; CFBP 2157; LMG 708) foi adquirida da Coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) e armazenada no Laboratório de Fitopatologia da UFSC em glicerol (30%) a -80 °C (Luiz et al., 2017).

3.2.2. Extração dos polissacarídeos do parênquima da babosa

Os polissacarídeos das folhas de *Aloe barbadensis* foram extraídos conforme o descrito por Luiz et al., 2012 e Luiz et al., 2017. Para tanto, removeu-se e triturou-se o parênquima de reserva das folhas de babosa. Posteriormente, adicionou-se etanol 92 °GL ao triturado (6:1 v/v). A mistura final foi mantida a 4°C durante 24 h para a floculação de polissacarídeos. A fração floculada foi filtrada e seca em estufa até o seu peso constante.

3.2.3. Preparo da suspensão dos polissacarídeos da babosa e das nanoemulsões

Os polissacarídeos do parênquima da babosa, previamente triturados, foram adicionados em água destilada até atingirem a concentração de 1,5 mg.mL⁻¹. A suspensão foi agitada (15 min, 13.500 rpm), autoclavada (20 min, 120° C) e, posteriormente, mantida em baixas temperaturas (4° C por 12 h). Antes da aplicação sobre as plantas, adicionou-se 0,1% de uma mistura de tensoativos (Tween 20 e Triton, 1:1 v/v) e submeteu-se o preparado às ondas ultrassônicas por 60 min.

Para o preparo das emulsões, a cada 100 mL da suspensão polissacarídica (1,5 mg.mL⁻¹) foram adicionados 0,4 mL de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) ou *Cymbopogon martini* (palmarosa). Em seguida, a mistura foi submetida às ondas ultrassônicas por 60 min, utilizando um banho de ultrassom (Luiz et al., 2017).

3.2.4. Aplicação das preparações e inoculação

Plantas com 5 folhas completamente expandidas foram pulverizadas com 10 mL de água destilada contendo 0,1% de tensoativo (grupo controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}).

Após 4 dias os morangueiros foram inoculados com *X. fragariae*. Para tanto, as folhas foram pulverizadas com 10 mL de suspensão bacteriana (DO 600 nm; abs 0,3 nm) e submetidas à câmara úmida por um período de 24 h. A severidade (%) da doença foi mensurada após 21 dias utilizando o software Quant (VALE et al., 2003). Foram avaliadas as duas folhas com maior índice de severidade de cada planta tratada (Luiz et al., 2017).

A partir dessas plantas, além da severidade, avaliou-se a varredura espectrofotométrica, o acúmulo de compostos fenólicos e a concentração de lignina. Além disso, determinou-se os fenóis por HPLC, mensurou-se parâmetros fisiológicos da planta e efetuou-se uma microscopia de varredura para avaliação dos estômatos e biofilme bacteriano.

3.2.5. Varredura espectrofotométrica

Para análise dos compostos presentes no extrato foliar, coletaram-se duas folhas de cada morangueiro tratado. Um vaso, contendo uma planta, foi considerado uma repetição. Os tempos de amostragem foram 0, 4 e 6 dias após a aplicação dos tratamentos. Na coleta realizada aos 6 dias após os tratamentos (equivalente a 2 dias após a inoculação), havia plantas tratadas e inoculadas, e plantas apenas tratadas.

As folhas coletadas foram previamente maceradas em nitrogênio líquido. Em seguida, 500 mg deste macerado foram homogeneizados em 10 mL de etanol-tolueno (1:1, v/v). O extrato resultante foi incubado por 15 min no escuro a uma temperatura ambiente. Seguido o período de incubação, o material foi centrifugado a 3500 rpm, por 5 min. Os sobrenadantes foram recuperados, diluídos em etanol-tolueno na proporção de 1:5 e submetidos à varredura espectrofotométrica (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader), com leitura da absorbância de 250 a 750 nm.

3.2.6. Microscopia de fluorescência

Para a avaliação microscópica de compostos fenólicos, coletaram-se 8 discos foliares (\varnothing 0,5 cm) por repetição. Um vaso, contendo um morangueiro, foi considerado uma unidade experimental.

As amostragens foram realizadas momentos antes e 6 dias após a aplicação dos tratamentos (Água destilada, AP, T_{AP} e P_{AP}). Aos 6 dias após os tratamentos (equivalente a 2 dias após a inoculação), havia plantas tratadas e inoculadas, e plantas apenas tratadas.

Imediatamente após a retirada do material vegetal, as amostras foram colocadas em uma solução fixadora, contendo tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7.0) e paraformaldeído (4%) numa proporção de 1:1 (v/v). Em seguida, foram colocadas em um dessecador a vácuo e armazenadas em geladeira por 24 h. Após o período de fixação, realizou-se um procedimento de lavagem das amostras. Para tanto, a solução de paraformaldeído foi removida e a de fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,2)

adicionada. A lavagem com o tampão foi efetuada duas vezes, por 15 min em cada troca. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma solução de álcool etílico a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O material vegetal ficou em contato com cada solução por 30 min à temperatura ambiente (adaptado de BOUZON, 2006).

A pré-infiltração das amostras foi realizada em 3 etapas, conforme as instruções do fabricante. Para tanto, o material vegetal foi submerso em uma solução de etanol (P.A.) e historesina glicolmetacrilato (Historesin, Leica®, Alemanha). A cada 12 h de contato com as amostras, aumentou-se a concentração de historesina na solução. Primeiramente, utilizou-se a proporção de 2:1 (v/v), posteriormente, 1:1(v/v) e, por último, 1:2 (v/v).

Para a finalização da infiltração, colocaram-se os discos vegetais por 48 h em contato com a resina pura. Em seguida, foi misturado o polimerizador, conforme as instruções do fabricante. As amostras foram emblocadas em moldes plásticos e seccionadas (5 µm) em micrótomo modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio.

Para a avaliação do acúmulo de compostos fenólicos, as secções foliares foram montadas em lâminas de vidro, sobre pequenas gotas de água, e secas em placa aquecedora (37 °C por 30 min). Posteriormente, o material foi analisado em microscópio de luz invertida IX-81 Olympus (modelo U-LH100HG, 19V 100W) equipado com sistema de fluorescência U-RFL-T (Tóquio, Japão).

As observações foram feitas sob luz UV (excitação de 340 a 380 nm com filtro barreira de 430 nm) e luz azul (excitação de 450 a 490 nm com filtro barreira de 515 nm), com ajuste dos tempos de exposição para 23.85 ms e 8.478 ms para cada filtro de luz. Considerou-se acúmulo de compostos fenólicos apenas os pontos com fluorescência em ambas as luzes. As imagens foram registradas com auxílio de uma câmera fotográfica (Olympus DP71, modelo U-TV0.5XC-3, Tóquio, Japão), associada a software cellSens 1.7 (Olympus).

3.2.7. Lignina

As análises de lignina foram realizadas conforme o descrito por Kuhn & Pascholati (2010), com adaptações. Para tanto, coletaram-se duas folhas de cada planta tratada. Cada morangueiro, por sua vez, foi considerado uma repetição.

As amostragens foliares foram efetuadas 6 dias após a aplicação dos tratamentos (equivalente a 2 dias após a inoculação). Na coleta, havia plantas tratadas e inoculadas, e plantas apenas tratadas.

Após a coleta, os tecidos foliares foram macerados em nitrogênio líquido e 200 mg de matéria fresca foram liofilizados. Ao material seco, acrescentaram-se 0,75 mL de metanol (80%). A mistura ficou sob agitação por 20 horas. Posteriormente, adicionaram-se 0,75 mL de água deionizada e centrifugou-se o agitado (10 min a 10.000 g). O sobrenadante foi descartado e o resíduo recuperado e seco a 65° C por 20 h.

Ao resíduo adicionaram-se 0,75 mL de uma solução de ácido tioglicólico e HCl 2,0 M (1:10, v/v). A mistura ficou sob agitação (100 rpm) por 4 horas e, em seguida, foi colocada no gelo (10 min) e centrifugada (10 min a 12.000 g). O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 0,75 mL de NaOH (0,5 M). Nessa etapa, as amostras foram agitadas por 20 horas a 100 rpm.

Após a agitação, centrifugou-se o material (10 min, 10.000 g) e recuperou-se o sobrenadante. O recuperado, posteriormente, acrescido de 200 µL de HCl (12 N), foi colocado em câmara fria (4° C) por 4 horas e centrifugado (10 min, 10.000 g). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de NaOH (0,5 M).

A leitura da absorbância da lignina extraída foi feita em leitor de microplacas (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader) a 280 nm. Os valores de absorbância foram normalizados em uma curva padrão de lignina.

3.2.8. HPLC

A determinação de compostos fenólicos presentes em folhas de morango tratadas com água destilada, AP, T_{AP} e P_{AP} foi efetuada através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para tanto, duas folhas de cada unidade experimental foram coletadas, 6 dias após a aplicação dos tratamentos (equivalente a 2 dias após a inoculação), e maceradas em nitrogênio líquido. Posteriormente, 100 mg de cada amostra foram homogeneizados em 3 mL de metanol a 80% (metanol: HCl = 80: 1, v / v). A mistura resultante foi colocada em câmara escura durante 1 h, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o material foi centrifugado (3000 g, 5 min) e o sobrenadante recuperado (Luiz et al., 2017).

Aliquotas de 10 μL do sobrenadante (extrato bruto) foram injetadas em equipamento de cromatografia líquida (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000) equipado com uma coluna de fase inversa (fase inversa C18, Phenomenex LC-18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm Ø interno, 40 ° C) e um detector espectrofotométrico UV-visível ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Cada amostra foi injetada no equipamento pelo menos 3 vezes.

Os compostos fenólicos foram analisados em cromatógrafo líquido de fase reversa Thermo Scientific UltiMate 3000RS Dual System, equipado com uma coluna C18 (Kinetex C18, 150 mm x 4,6 mm Ø interno, 2,6 μm particular), termostatizada a 25°C e detector UV-visível ($\lambda = 280 \text{ nm}$). Aliquotas de 10 μL do sobrenadante (extrato bruto) foram injetadas no cromatógrafo, sendo eluídas com fluxo de 1,0 mL/min, utilizando gradiente linear de água acidificada (TFA 0,1%) e acetonitrila.

A identificação dos compostos de interesse foi realizada através da comparação entre os tempos de retenção das amostras com os tempos de retenção de compostos- padrão (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido sirínico, epicocatequina galato, ácido sinápico e ácido salicílico).

A quantificação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando as curvas padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em μg por g de peso fresco ($\mu\text{g.gFW}^{-1}$).

3.2.9. Análises fisiológicas

Para a avaliação da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração, foram aplicados 10 mL de AP, T_{AP} ou P_{AP} por planta, conforme descrito anteriormente. Morangueiros aspergidos com água destilada (contendo emulsificantes) foram considerados o grupo controle. Após 4 dias da aplicação, foi realizada a inoculação com *X. fragariae* (DO 600 nm; abs. 0,3 nm), com a manutenção dos vasos em câmara úmida por um período de 24 h. Plantas tratadas e não inoculadas também foram mantidas sob câmara úmida durante o mesmo período.

Após 24 horas da retirada da câmara úmida, ou seja, 6 dias após a aplicação dos tratamentos, mediu-se a taxa fotossintética ($\mu\text{M CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a transpiração ($\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com auxílio do analisador de gás por infravermelho (Licor Li 6400 XT Portable Photosynthesis System). A Densidade de Fluxo de Fótons Fotossinteticamente Ativos (DFFFA) foi fixada em 1000 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Além das trocas gasosas, foram efetuadas avaliações da eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m) e da fluorescência inicial (F_0), máxima (F_m) e variável ($F_v = F_m - F_0$). Para tanto, as plantas tratadas foram previamente colocadas em uma câmara escura por 30 min e, em seguida, submetidas às determinações fisiológicas. Os parâmetros foram mensurados com auxílio de um fluorímetro portátil de luz modulada MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Germany) (HENRIQUES, 2009).

3.2.10. Microscopia de varredura

Aos 6 dias após a aplicação de água destilada, AP e T_{AP} nas plantas, equivalente a 2 dias após a inoculação, foi realizada a coleta de um disco foliar (\varnothing 5 cm) por repetição. Neste período, havia plantas apenas tratadas, e plantas tratadas e inoculadas. Neste experimento, foram efetuadas 3 repetições por tratamento. Um vaso, contendo uma planta, foi considerado uma unidade experimental.

Para o estudo da superfície foliar de morangueiro, os discos foliares coletados seguiram os mesmos métodos de fixação, lavagem e desidratação utilizados para a microscopia de fluorescência.

Posteriormente aos procedimentos preparatórios, as amostras foram secas com ponto crítico de CO₂ EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). As folhas secas foram posicionadas sobre suportes de alumínio (Stubs), com a parte abaxial voltada para baixo. O posicionamento foi efetuado com auxílio de uma pinça e fita de carbono dupla face. Em seguida as amostras foram cobertas com 20 nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030.

As observações microscópicas foram feitas e documentadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (marca Jeol, modelo JSM-6390LV; JEOL Ltd., Tóquio, Japão) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). O equipamento foi operado em 10 kV e com aumentos que variaram entre 500 a 5000 vezes.

3.2.11. Análise estatística

Os experimentos foram realizados sob delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Cada vaso contendo uma planta foi considerado uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one way* ou *fatorial*) e ao teste de Student-

Newman-Keuls (SNK). As análises foram realizadas através do software estatísticos Statistica 8.0 (Statisoft 2010).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Severidade da doença

Após 21 dias da inoculação, as plantas da cultivar Albion tratadas com água (grupo controle) apresentaram severidade da mancha angular do morangueiro equivalente à 76,3%, significativamente maior do que a severidade apresentada nas plantas tratadas com a suspensão polissacarídica da babosa (AP), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) e ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). Sendo assim, AP foi capaz de reduzir 90 % a severidade da doença, com relação à testemunha. T_{AP} e P_{AP} , em média, diminuiram quase em 98.8 % os sintomas da mancha, quando comparados com o grupo controle.

As plantas da cultivar San Andreas tratadas com água destilada apresentaram severidade 2 vezes menor do que a observada nos morangueiros da cultivar Albion. Nesta cultivar, AP, T_{AP} e P_{AP} , em média, reduziram 97 % os sintomas da doença, em relação às plantas tratadas com água (Tabela 1).

Tabela 1. Severidade da mancha angular (*Xanthomonas fragariae*) após 21 da inoculação de morangueiros tratados com água destilada (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). As plantas foram tratadas 4 dias antes da inoculação.

Tratamento/Cultivar	Albion	San Andreas
Água	$76,3 \pm 10,9$ a ^{*1}	$38,4 \pm 15,3$ a **
AP	$6,9 \pm 2,4$ b *	$1,4 \pm 1,4$ b **
T_{AP}	$0,6 \pm 0,8$ c	$0,7 \pm 0,7$ b
P_{AP}	$0,9 \pm 1,0$ c	$0,5 \pm 0,4$ b

¹Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística significativa entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

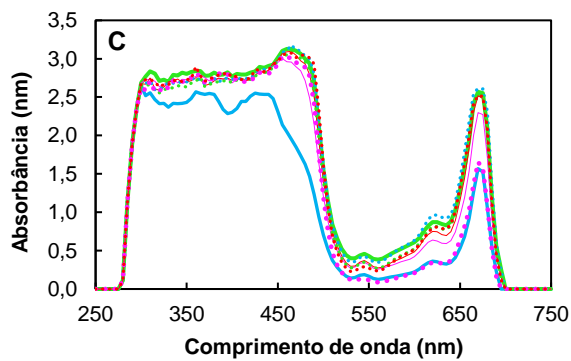
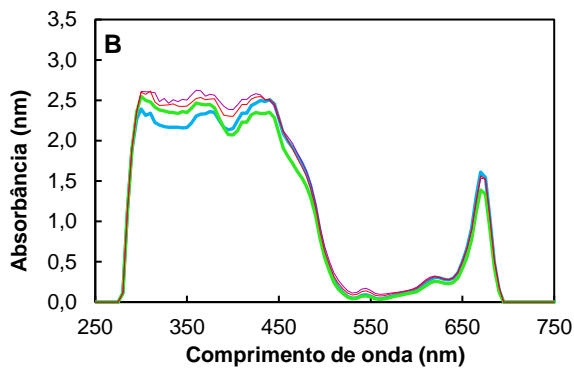
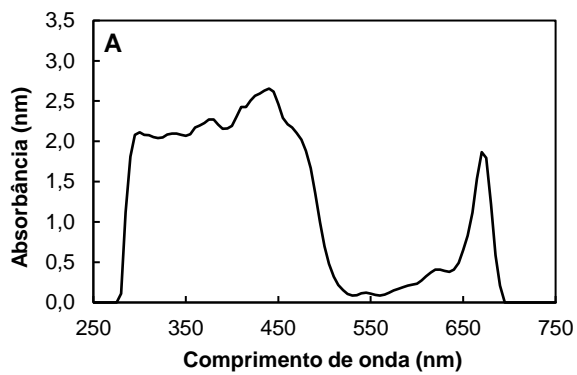
3.3.2. Varredura espectrofotométrica

As absorbâncias do extrato de folhas de plantas não tratadas da cv. San Andreas, mensuradas em um comprimento de onda de 300 nm a 680 nm, apresentaram-se significativamente maiores do que as absorbâncias do extrato de folhas de plantas não tratadas da cv. Albion (Figura 1A e 1D).

O perfil espectral do produto da extração foliar dos morangueiros da cv. San Andreas, que foram pulverizados 4 ou 6 dias antes da coleta do material vegetal, apresentou-se igual ao perfil da porção extraída de folhas coletadas momentos antes da aplicação dos tratamentos. Isto significa que AP, T_{AP} e P_{AP} não influenciaram no perfil espectrofotométrico do extrato de folhas desta cultivar (Figura 1D, 1E e 1F).

Constatou-se que a suspensão, emulsão e nanoemulsão, após 4 dias da pulverização sobre os morangueiros da cv. Albion, elevaram a concentração de determinados compostos no órgão fotossintetizante (Figura 1B), principalmente daqueles mensurados de 300 a 350 nm. Na faixa de 355 a 400 nm, apenas as plantas submetidas ao T_{AP} ou P_{AP} apresentaram um aumento significativo nas absorbâncias. Quando lida de 400 a 450 nm, notou-se que AP elevou a capacidade intrínseca do material estudado de absorver energia do feixe de luz incidente.

Quando aplicado feixes de luz de 300 a 450 nm, os extratos de folhas da cv. Albion não inoculadas e tratadas com AP, T_{AP} e P_{AP} 6 dias antes da coleta do material vegetal, não apresentaram absorbâncias distintas dos extratos de plantas tratadas com água. Contudo, após a inoculação, os morangueiros submetidos à suspensão ou emulsões mantiveram a absorbância maior do que a do grupo controle. A 670 nm, apenas o extrato foliar de morangueiros, não inoculados e pulverizados com T_{AP}, diferiu-se do grupo controle. Todavia, após a inoculação, todos os preparados foram capazes de elevar a absorbância dos extratos foliares, com relação aos tratados com água (Figura 1C).



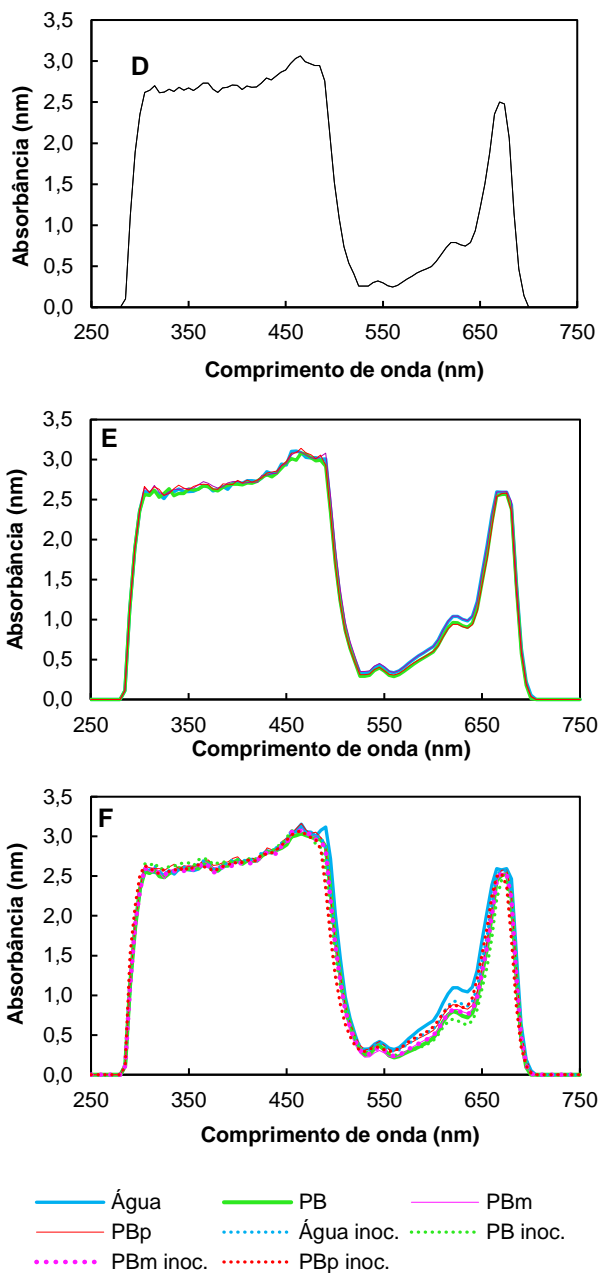


Figura 1. Varredura espectrofotométrica de morangueiros da cultivar Albion e San Andreas tratados com suspensão polissacarídica da babosa (AP); emulsão

de óleo de tea tree (T_{AP}); nanoemulsões de óleo de palmarosa (P_{AP}); água destilada contendo emulsificantes (controle). Perfis espectrofotométricos da cv. Albion antes dos tratamentos (A), aos 4 dias após os tratamentos (B) e aos 6 dias após os tratamentos de plantas inoculadas ou não com *Xanthomonas fragariae* (C). Perfis espectrofotométricos da cv. San Andreas antes dos tratamentos (D), aos 4 dias após os tratamentos (E) e aos 6 dias após os tratamentos de plantas inoculadas ou não com *Xanthomonas fragariae* (F).

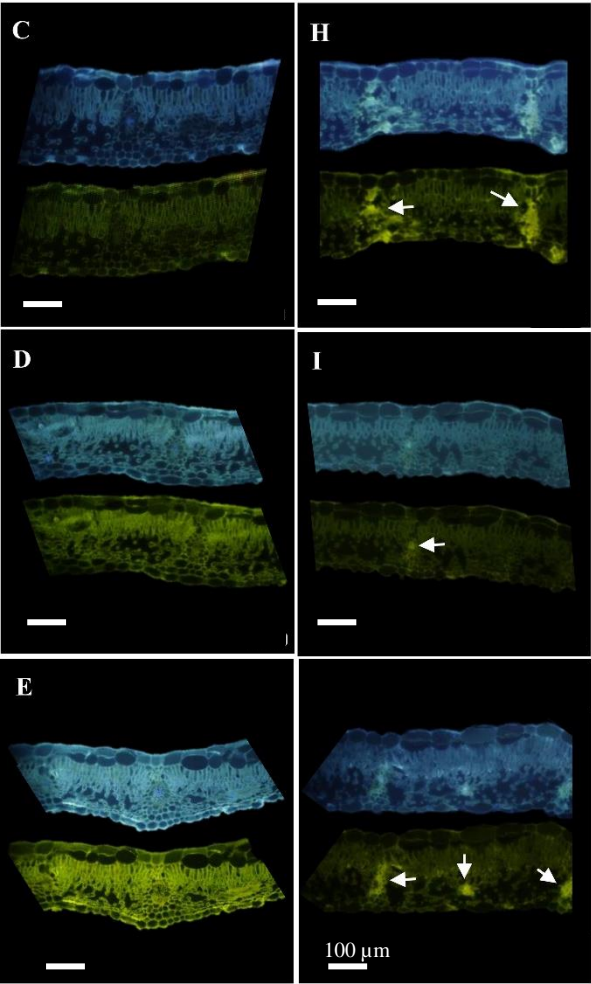
3.3.3. Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência demonstrou a presença e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de morangueiro da cultivar Albion e San Andreas (Figura 2).

Plantas não inoculadas e tratadas com a suspensão polissacarídica da babosa (AP), emulsão de óleo essencial de tea tree (T_{AP}) ou óleo essencial de palmarosa (P_{AP}) não apresentaram acúmulo de compostos fenólicos no interior das folhas (dados não mostrados) e não apresentaram imagens distintas das observadas nas secções de folhas apenas tratadas com água (Figura 2A e 2F).

Após a inoculação, ambas as cultivares tratadas com água destilada apresentaram crescimento bacteriano no interior das folhas, desordem das camadas foliares e acúmulo de compostos fenólicos (Figura 2B e 2G).

Nas plantas da cultivar San Andreas tratadas com AP, T_{AP} ou P_{AP} e inoculadas, verificou-se um acúmulo de fenólicos (Figura 2 H, I e J). Contudo, na cultivar Albion, os tratamentos não promoveram modificações distintas das observadas nas plantas tratadas com água e não inoculadas (Figura C, D e E).



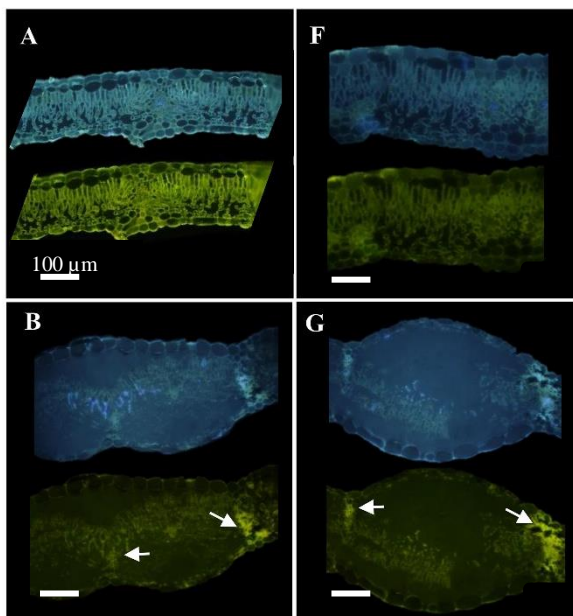


Figura 2. Microscopia de fluorescência de secções transversais de folhas de morangueiros da cultivar Albion (A, B, C, D e E) e da cultivar San Andreas (F, G, H, I e J) 6 dias após o tratamento com Água destilada (B e G), AP (C e H), T_{AP} (D e I) ou P_{AP} (E e J), em plantas inoculadas com *X. fragariae* 2 dias antes da coleta. A e F se referem a plantas apenas tratadas com água destilada, não inoculadas. Setas indicam acúmulo de compostos fenólicos.

3.3.4. Lignina

As análises estatísticas apontaram interação entre tratamento, inoculação e cultivar. Nos morangueiros da cultivar Albion, não foi verificado diferença estatística significativa entre os tratamentos e entre plantas inoculadas e não inoculadas. Contudo, morangueiros inoculados da cultivar Albion, tratados com AP ou P_{AP}, deferiram-se estatisticamente da cultivar San Andreas submetidas aos mesmos tratamentos (Figura 3).

Na cultivar San Andreas observou-se diferença estatística entre tratamentos e inoculação. Plantas tratadas com AP, T_{AP} ou P_{AP}, não inoculadas, não apresentaram resultados distintos dos observados nas pulverizadas com água. Contudo, plantas tratadas com AP e P_{AP}, submetidas à inoculação com o patógeno 4 dias depois, apresentaram resultados estatisticamente distintos e maiores do que os apresentados no grupo controle. Os morangueiros inoculados, previamente tratados com T_{AP}, não apresentaram teores de lignina estatisticamente diferentes dos observados nas testemunhas (Figura 3).

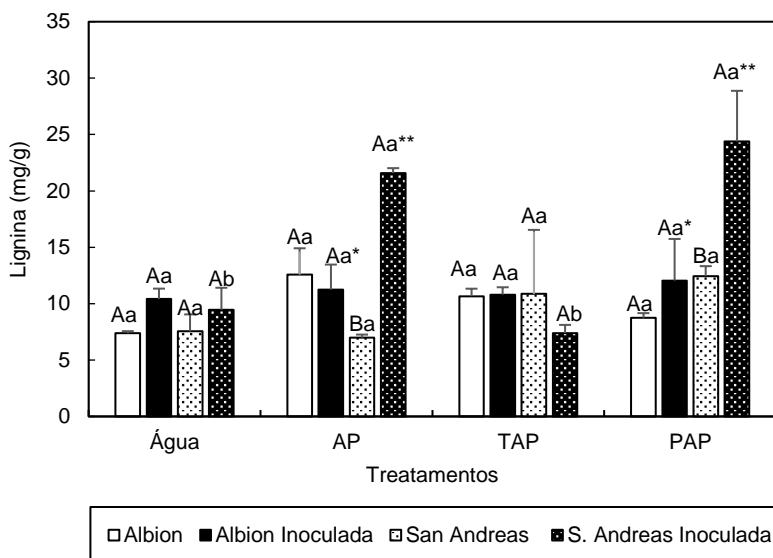


Figura 3. Concentração de lignina em folhas de morangueiro (cv. Albion e cv. San Andreas) aos 6 dias após a aplicação dos tratamentos (água – controle; suspensão polissacarídica da babosa – AP; emulsão de óleo de tea tree – T_{AP}; nanoemulsão de palmarosa – P_{AP}) de plantas inoculadas ou não com *Xanthomonas fragariae*. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

3.3.5. HPLC

No total foram detectados 13 compostos fenólicos nas folhas de morangueiro. Destes, 7 foram identificados (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido sirínico, epigallocatequina galato -EGCG e ácido salicílico). A concentração de todos os compostos foi influenciada pelo tratamento, inoculação e cultivar, sendo observado uma interação significativa entre os fatores (Tabela 2).

A quantidade de ácido gálico por g de massa fresca, nos morangueiros não inoculados da cultivar Albion, foi incrementada após a ministração de AP, T_{AP} e P_{AP} sobre os trifolios. Sendo que as plantas, submetidas aos referidos tratamentos, não demonstraram resultados estatisticamente diferentes entre si, porém, divergentes dos observados nas do grupo controle. Após a inoculação, AP e T_{AP} elevaram ainda mais a concentração de ácido gálico no vegetal. As pulverizadas com água e inoculadas sofreram decréscimos na concentração do ácido fenólico, quando comparadas com as não inoculadas. Além disso, certificou-se que os níveis deste ácido orgânico reduziram após a inoculação das submetidas ao P_{AP}.

Na San Andreas, a elevação da concentração de ácido gálico foi constatada nas folhas não inoculadas e aspergidas com AP, T_{AP} e P_{AP}, com relação às testemunhas. AP promoveu maiores níveis do composto analisado, quando comparadas com os demais tratamentos. Após a inoculação, as testemunhas apresentaram um aumento da concentração do ácido orgânico, com relação às não inoculadas. Plantas borrifadas com AP e T_{AP} não exibiram dados distintos dos revelados no grupo controle. As pulverizadas com P_{AP} revelaram um declínio significativo da fração deste composto fenólico nas folhas, com relação aos demais tratamentos.

A concentração de ácido clorogênico, nos morangueiros não inoculados da cultivar Albion, foi elevada com a aplicação da suspensão de polissacarídeos da babosa (AP) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). Após a introdução do patógeno, o grupo controle apresentou incremento na concentração do ácido.

A San Andreas foi influenciada de forma significativa com a aplicação dos tratamentos. Plantas não inoculadas e tratadas com AP sofreram um incremento substancial na quantidade de ácido clorogênico por grama de massa fresca, quando comparado com os morangueiros pulverizados com água, T_{AP} ou P_{AP}. Contudo, após a inoculação, os níveis

deste composto fenólico foram reduzidos aos encontrados no grupo controle das não inoculadas.

Na cultivar Albion, a concentração de ácido ferúlico nos morangueiros não inoculados tratados com P_{AP} não diferiram dos pulverizados com água. Além disso, verificou-se que AP foi capaz de elevar significativamente a quantidade deste composto nas folhas desta variedade, quando comparado com a testemunha. Nas tratadas com T_{AP} não foi possível detectar a presença do ácido fenólico.

Após a inoculação da Albion, a concentração do ácido ferúlico das plantas tratadas com água destilada manteve-se igual à observada nas não inoculadas. As tratadas com P_{AP} não demonstraram resultados distintos dos alcançados no grupo controle. Contudo, verificou-se que AP e T_{AP} promoveram igualmente um acréscimo significativo na concentração do ácido orgânico, em relação às testemunhas.

Contatou-se que a San Andreas possui uma maior concentração de ácido ferúlico, quando comparado com a cultivar Albion. Nas plantas tratadas com AP observou-se uma maior concentração do composto fenólico nas folhas em relação à testemunha, independente da inoculação. T_{AP} e P_{AP} promoveram resultados semelhantes entre si, porém menores e distintos dos notados nas testemunhas.

A inoculação dos morangueiros promoveu um aumento da quantidade do fenólico nas folhas tratadas com água. Porém, levou à redução nas aspergidas com AP. Apesar do contato do patógeno ter provocado um declínio no nível do ácido ferúlico nas plantas tratadas com AP, a concentração do composto orgânico manteve-se superior nesta população, quando comparados com as testemunhas. Nas inoculadas e submetidas ao P_{AP} não foi possível detectar a presença do fenólico.

A concentração de ácido vanílico foi influenciada pela aplicação dos tratamentos. Plantas não inoculadas da cultivar Albion apresentaram maiores teores do composto após a aplicação de AP e P_{AP} , com relação às testemunhas. Nas tratadas com T_{AP} não foi possível detectar a presença do fenólico. Porém, após a inoculação das plantas submetidas a este tratamento, verificou-se um aumento substancial do ácido orgânico.

O tratamento das plantas não inoculadas da cultivar San Andreas com P_{AP} não promoveu alterações na concentração de ácido vanílico, quando comparado com o grupo controle. Contudo, T_{AP} foi capaz de aumentar os níveis do composto nas folhas. Após a inoculação, verificou-se um acréscimo significativo do fenólico nas plantas tratadas com água, as quais apresentaram resultados estatisticamente distintos dos demais

tratamentos. Nos morangueiros inoculados e tratados com P_{AP} não foi possível detectar a presença do composto fenólico.

O ácido sirínico foi detectado nas folhas de morangueiro da cultivar Albion e San Andreas e sua concentração foi influenciada pela aplicação dos tratamentos. Na cultivar Albion, não inoculada, observou-se uma elevação nos teores deste composto após a aplicação de AP e P_{AP} . Nas plantas tratadas com T_{AP} não foi detectado a presença do composto. O fator inoculação influenciou significativamente na quantidade do fenólico por g de massa fresca. Folhas tratadas com água, AP e T_{AP} apresentaram um aumento do ácido orgânico com relação às plantas não inoculadas. Sendo que os vegetais pulverizados com AP e T_{AP} não expressaram resultados estatisticamente distintos entre si, porém maiores e diferentes das testemunhas. P_{AP} reduziu o nível do composto fenólico sobre as folhas, quando comparado com a testemunha.

As plantas não inoculadas da cultivar San Andreas apresentaram comportamento similar ao constatado na cultivar Albion, com relação a concentração do ácido sirínico. Porém, após a inoculação plantas tratadas com água mostraram maior quantidade do composto fenólico do que o manifestado nos morangueiros submetidos aos demais tratamentos.

A concentração da epigallocatequina galato (EGCG) foi alterada pela aplicação dos tratamentos. Plantas não inoculadas da cultivar Albion e tratadas com AP apresentaram resultados estatisticamente iguais aos apresentados nas testemunhas. Não foi possível detectar a presença do composto nas plantas tratadas com T_{AP} . P_{AP} levou à redução da concentração do flavonoide, com relação ao grupo controle. A inoculação promoveu a redução da concentração do composto orgânico nas plantas tratadas com água e a elevação nas plantas tratadas com AP, T_{AP} e P_{AP} .

Na cultivar San Andreas, não inoculada, a quantidade de EGCG por grama de massa fresca apresentou-se maior nas plantas tratadas com água, com relação aos demais tratamentos. Após a inoculação, as pulverizadas com água, AP ou T_{AP} não demonstraram resultados estatisticamente distintos entre si. Não foi detectado a presença do composto fenólico nas plantas submetidas ao P_{AP} .

A concentração de ácido salicílico nas plantas da cultivar Albion, não inoculadas, foi aumentada com a pulverização de AP, com relação às testemunhas. Plantas tratadas com P_{AP} não diferiram das do grupo controle. Não foi possível verificar a presença do ácido nos morangueiros tratados com T_{AP} . Após a inoculação, as tratadas com água, AP e P_{AP} continuaram com o mesmo nível do composto apresentado nas não

inoculadas. Porém, a introdução do patógeno elevou os teores do ácido fenólico nas submetidas ao tratamento com T_{AP} .

Nas San Andreas não inoculadas T_{AP} e P_{AP} reduziram a concentração do ácido salicílico com relação à testemunha e às pulverizadas com AP. Após a inoculação, plantas tratadas com água ou AP, não diferiram entre si, porém, demonstraram elevação dos níveis do composto com relação aos demais tratamentos. Morangueiros aspergidos com T_{AP} apresentaram valores 2 vezes maiores do que os detectados nas plantas não inoculadas e submetidas ao mesmo tratamento. Contudo, este resultado foi estatisticamente menor e distintos do grupo controle.

De um modo geral, observou-se que a cultivar Albion possui uma menor concentração de compostos fenólicos do que a San Andreas.

Nas não inoculadas, o tratamento com AP foi capaz de aumentar em 1,8 vezes a concentração total de fenóis em tecidos foliares da Albion e 1.4 vezes em folhas da cultivar San Andreas, quando comparados com a testemunha.

Plantas Albion tratadas com AP, após a inoculação, apresentaram concentração de compostos fenólicos 1.18 vezes maiores do que as não inoculadas e submetidas ao mesmo tratamento. Na San Andreas, a inoculação das tratadas com a suspensão de polissacarídeos da babosa provocou uma redução significativa destes compostos.

Nos morangueiros Albion, tratados com a emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}), verificou-se uma redução significativa de compostos fenólicos totais, quando comparadas com as testemunhas. Contudo, após a inoculação observou-se um aumento de 34,6 vezes na concentração de fenóis nestas plantas, quando comparado com as não inoculadas e submetidas ao óleo.

Nas Albion não inoculadas, P_{AP} promoveu um acréscimo significativo na quantidade de fenólicos totais, quando comparados com a testemunha. Após a inoculação os compostos fenólicos reduziram significativamente em ambas as cultivares, quando comparado com as plantas tratadas com a nanoemulsão e não inoculadas.

Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos (mg.g MF⁻¹) em morangueiros da cultivar Albion e San Andreas tratados com Água (testemunha), suspensão polissacarídica a babosa (AP), emulsão de óleo de Tea tree (T_{AP}) ou nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}) e inoculados ou não com *X. fragariae*. TR = Tempo de Retenção.

Plantas não inoculadas					
Composto	Cultivar	Água	AP	T _{AP}	P _{AP}
TR	Albion	3.6 Bc ** ¹	7.2 Ba **	0.0 Bd **	5.8 Ab **
1.55 min	S. Andreas	8.3 Ac *	11.8 Ba *	8.6 Bb *	7.9 Ad *
Ác. Gálico	Albion	0.7 Bb **	1.3 Ba **	1.1 Ba **	1.3 Aa **
	S. Andreas	1.3 Bb *	2.9 Aa *	2.0 Ac *	2.0 Ac *
TR	Albion	1.1 Bc **	2.1 Bb **	0.0 Bc **	5.0 Aa *
1.80 min	S. Andreas	2.7 Aa *	3.3 Aa *	3.2 Aa *	2.7 Aa **
TR	Albion	0.0 Bc *	0.3 Bb **	0.0 Bc **	0.5 Aa *
4.02 min	S. Andreas	0.0 Ad *	1.5 Aa *	1.1 Ab *	0.5 Ac *
Ác. Clorogênico	Albion	0.1 Bc **	0.7 Aa **	0.0 Bc **	0.5 Bb *
	S. Andreas	0.4 Ab *	2.7 Aa *	0.4 Ab *	0.4 Ab **
Ác. Ferúlico	Albion	1.5 Ab **	5.6 Aa **	0.0 Bc **	1.9 Ab **
	S. Andreas	4.0 Bb *	7.0 Aa *	3.1 Bc *	2.6 Ac *
Ác. Vanílico	Albion	4.4 Bc **	6.8 Aa **	0.0 Bd **	5.1 Ab **
	S. Andreas	9.6 Bc *	10.5 Aa *	10.1 Bb *	9.2 Ad *
TR	Albion	3.4 Ac *	4.6 Ba *	0.0 Bd **	3.6 Ab *
4.63 min	S. Andreas	3.0 Aa **	2.9 Aa **	2.8 Aa *	2.1 Ab **
Ác. Siringico	Albion	1.1 Bc **	2.1 Ba **	0.0 Bd **	1.5 Ab **
	S. Andreas	2.1 Bb *	2.9 Aa *	0.0 Bc *	2.2 Ab *
EGCG	Albion	0.5 Aa *	0.5 Ba *	0.0 Bc *	0.4 Bb *
	S. Andreas	0.3 Aa **	0.2 Ab **	0.0 B c *	0.2 Ab **
Ác. Salicílico	Albion	0.3 Ab *	0.5 Ba *	0.0 Bc **	0.2 Ab *
	S. Andreas	0.3 Ba *	0.3 Ba **	0.2 Bb *	0.1 Ab **
TR	Albion	0.6 Bc **	0.8 Aa *	0.0 Bd **	0.7 Ab *
9.59 min	S. Andreas	0.7 Ac *	0.8 Ab *	1.0 Aa *	0.6 Ad **
TR	Albion	0.6 Aa **	0.6 Aa **	0.0 Bb **	0.7 Aa *
10.2 min	S. Andreas	0.9 Ab *	0.8 Ac *	1.3 Aa *	0.8 Ac *
Total	Albion	17.9 Bc **	33.3 Ba **	1.1Bd **	27.2 Ab **
	S. Andreas	33.5 Bb *	47.5 Aa *	33.8 Bb *	31.2 Ac *
Plantas inoculadas					
Composto	Cultivar	Água	AP	T _{AP}	P _{AP}
TR	Albion	5.3 Ac **	7.9 Ab **	8.2 Aa **	4.4 Bd **
1.55 min	S. Andreas	7.9 Ac *	8.3 Bb *	9.0 Aa *	0.0 Bd *
Ác. Gálico	Albion	1.2 Ab **	1.8 Aa *	1.5 Aab **	0.5 Bc **
	S. Andreas	1.7 Aab *	1.6 Bb *	2.0 Aa *	1.1 Bc *
TR	Albion	4.6 Ac *	7.4 Aa *	6.8 Ab *	4.2 Bc *
1.80 min	S. Andreas	2.6 Aa **	3.0 Aa **	3.1 Aa **	0.0 Bb **
TR	Albion	0.2 Ab *	0.5 Aa *	0.5 Aa *	0.2 Bb *
4.02 min	S. Andreas	0.0 Ab **	0.0 Bb **	0.9 Ba **	0.0 Bb **
Ác. Clorogênico	Albion	0.3 Ab *	0.2 Bb **	1.0 Aa*	1.1 Aa *
	S. Andreas	0.3 Aa *	0.2 Ba *	0.4 Aa **	0.0 Bb **
Ác. Ferúlico	Albion	1.5 Ab **	3.4 Ba **	3.5 Aa **	1.1 Bb *
	S. Andreas	4.7 Ab *	5.3 Ba *	4.2 Ab*	0 ± 0 Bc**

Ác. Vanílico	Albion	5.0 Ac **	7.1 Aa **	6.8 Ab **	4.7 Bd *
	S. Andreas	11.0 Aa *	10.1 Bc *	10.4 Ab *	0.0 Bd **
TR 4.63 min	Albion	2.5 Bd **	5.6 Aa *	4.8 Ab *	3.5 Ac *
	S. Andreas	2.7 Bb *	2.7 Bb **	2.9 Aa **	0.0 Bc **
Ác. Siríngico	Albion	1.7 Ab **	2.4 Aa **	2.3 Aa *	1.2 Bc *
	S. Andreas	3.1 Aa *	2.7 Bb *	2.0 Ac *	0.0 Bd **
EGCG	Albion	0.2 Bc **	0.6 Aa *	0.5 Ab *	0.6 Aa *
	S. Andreas	0.3 Aa *	0.2 Aa **	0.2 Aa **	0.0 Bb **
Ác. Salicílico	Albion	0.2 Ab **	0.6 Aa *	0.2 Ab **	0.2 Ab *
	S. Andreas	0.7 Aa *	0.7 Aa *	0.4 Ab *	0.0 Bc **
TR 9.59 min	Albion	0.7 Aa *	0.7 Aa **	0.8 Aa **	0.6 Bb *
	S. Andreas	0.7 Ac *	0.8 Ab *	0.8 Ba *	0.0 Bd **
TR 10.2 min	Albion	0.5 Ab *	0.7 Aa *	0.7 Aa *	0.6 Bb *
	S. Andreas	0.6 Bb *	0.7 Ba *	0.7 Ba *	0 Bc **
Total	Albion	24.3 Ad **	38.9 Aa *	37.7 Ab *	22.8 Bc *
	S. Andreas	36.4 Aa *	36.3 Ba **	37.3 Aa *	1.1 Bb **

¹Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre plantas inoculadas e não inoculadas, minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

3.3.6. Taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração

Seis dias após a aplicação dos tratamentos (2 dias após a inoculação), efetuou-se uma avaliação da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração dos morangueiros da cv. Albion e San Andreas. As análises estatísticas demonstraram uma interação significativa entre os fatores inoculação, cultivar e tratamentos. Sendo assim, observou-se que a inoculação promoveu aumento na taxa de fotossíntese, condutância estomática e transpiração nas plantas da cv. Albion. Plantas tratadas com água, após a introdução do patógeno, apresentaram um aumento nos parâmetros avaliados. AP e T_{AP} não promoveram resultados distintos das testemunhas. P_{AP} , após a inoculação, promoveu uma redução nas taxas fisiológicas analisadas, quando comparados com a testemunha. A cv. San Andreas não apresentou alterações significativas nos parâmetros com a aplicação dos preparados (Figura 4).

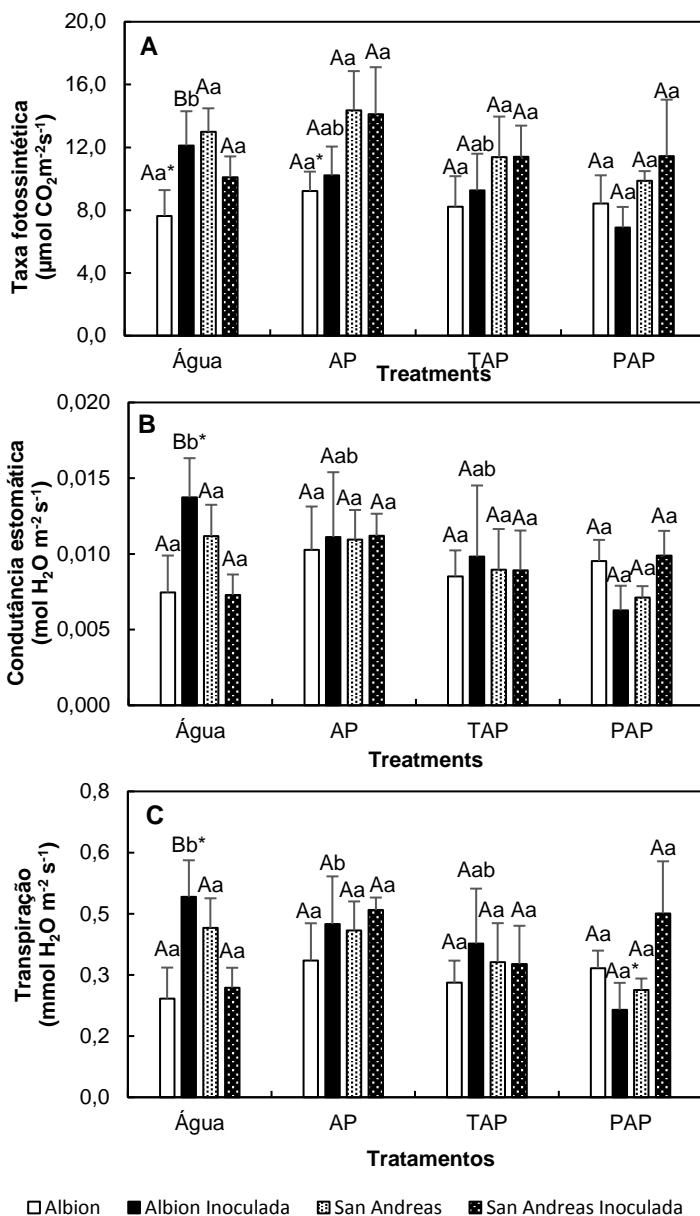


Figura 4. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B) e transpiração (C) em folhas de morangueiros das cultivares Albion e San Andreas 6 dias após o tratamento (dat) com água destilada (controle), Suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). Parte das plantas foram inoculadas com *Xanthomonas fragariae* aos 4 dat. Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

3.3.7. Eficiência quântica máxima do Fotossistema II (PSII)

Não foi observado modificações na eficiência quântica máxima do Fotossistema II (PSII) após a aplicação dos tratamentos e da inoculação (dados não mostrados).

3.3.8. Fluorescência inicial da clorofila

Momentos antes da aplicação dos tratamentos sobre as plantas não foi verificado diferença estatística significativa entre as cultivares (Figura 5 - ST).

No segundo dia após a pulverização, não foi possível verificar influência de AP, T_{AP} e P_{AP} sobre a fluorescência inicial da clorofila (Figura 5 - 2 DAT). Contudo, observou-se diferença estatística significativa entre as cultivares Albion e San Andreas após 4 dias da aplicação da suspensão polissacarídica e das emulsões. Os demais fatores não influenciaram no parâmetro avaliado (Figura 5 - 4 DAT).

Aos 6 dias verificou-se diferença estatística entre a média das plantas inoculadas e a média das não inoculadas. Neste intervalo de tempo não foi verificado interação entre os fatores estudados (Figura 5 - 6 DAT).

Dez dias após a aplicação dos tratamentos sobre as plantas verificou-se uma interação significativa entre o fator inoculação e cultivar. Sendo assim, a média das plantas inoculadas diferiu-se estatisticamente da média das plantas não inoculadas. Além disso, a cultivar Albion diferiu-se da cultivar San Andreas (Figura 5 - 10 DAT).

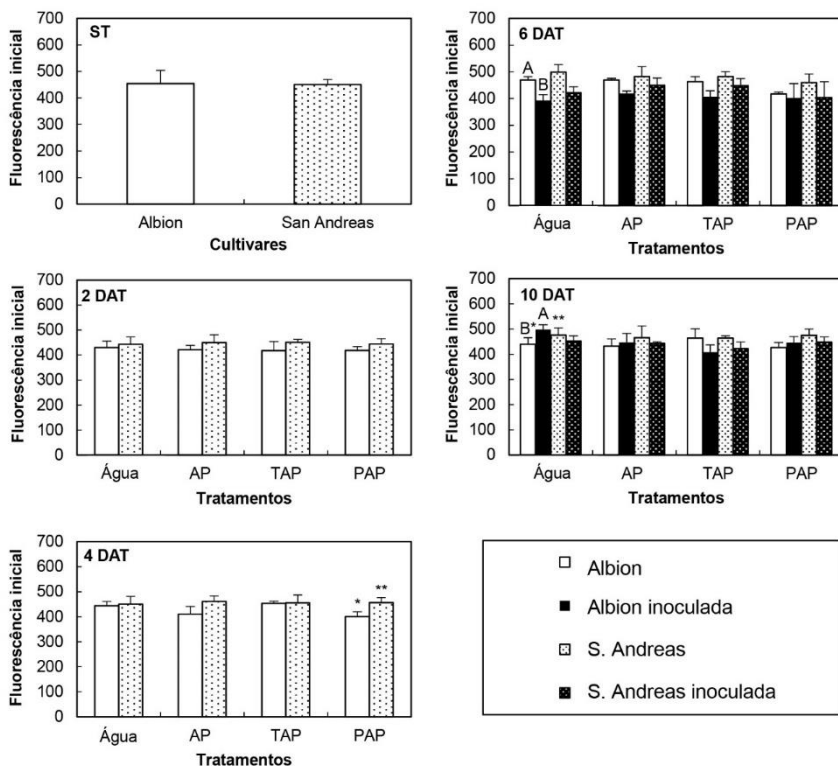


Figura 5. Fluorescência inicial (F_0) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) e aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com Água (controle), Suspensão polissacarídica da babosa (AP, $1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

3.3.9. Fluorescência máxima da clorofila

Não foi verificado diferença estatística significativa entre Albion e San Andreas momentos antes da aplicação de AP, T_{AP} ou P_{AP} sobre as plantas (Figura 6 – ST). Contudo, após 2 dias da aplicação dos tratamentos, a fluorescência máxima da clorofila na cultivar Albion foi significativamente menor em relação a San Andreas. Os tratamentos não promoveram alterações no parâmetro avaliado neste período (Figura 6 – 2 DAT). No quarto dia não foi verificado diferença estatística entre os fatores (Figura 6 – 4 DAT).

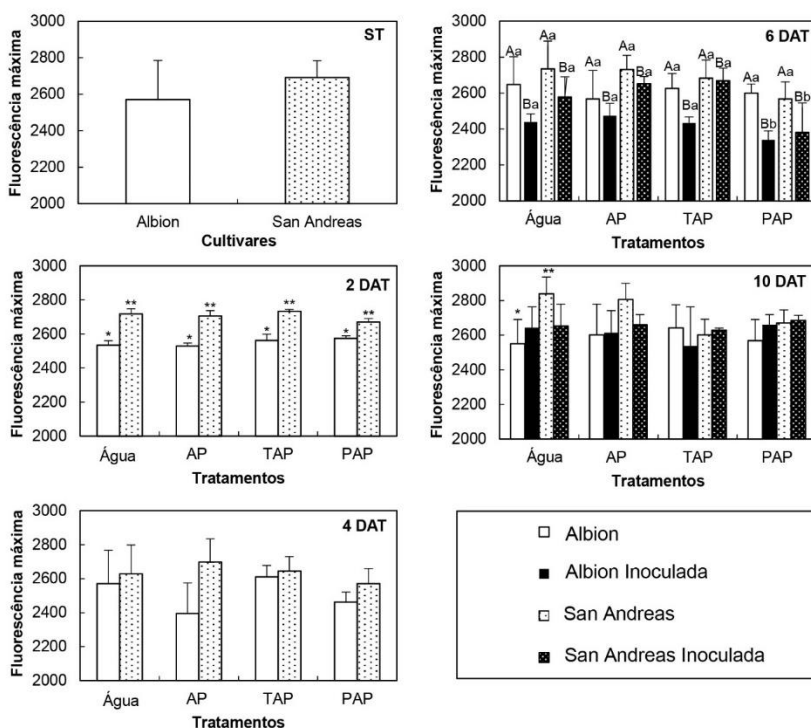


Figura 6. Fluorescência máxima (Fm) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com água (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.mL⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) ou com Nanoemulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}). Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras

minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

No sexto dia após o tratamento, verificou-se uma interação significativa entre inoculação e tratamento. Sendo assim, neste período de avaliação, verificou-se que a inoculação promoveu uma redução no parâmetro avaliado em ambas as cultivares, independente do tratamento prévio. Nas plantas não inoculadas, não foi verificado diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, nas plantas inoculadas, verificou-se que as tratadas com água, em média, diferiam-se estatisticamente das tratadas com a P_{AP} . Tratamentos com T_{AP} e AP não diferiram da água (Figura 6 – 6 DAT). Aos 10 dias, não se verificou interação entre os fatores avaliados. Contudo, em média, os cultivares diferiram-se estatisticamente entre si (Figura 6 – 10 DAT).

3.3.10. Fluorescência variável

Momentos antes, aos 2 e 4 dias após a pulverização dos tratamentos sobre as plantas, não foi verificado influência dos fatores avaliados sobre a fluorescência variável das plantas (Figura 7 – ST; 2 DAT; 4 DAT). Contudo, 6 dias após, verificou-se interação entre os fatores tratamento e inoculação.

Plantas tratadas com P_{AP} e inoculadas, em média, diferiram-se das pulverizadas com P_{AP} e não inoculadas. Entre as não inoculadas não foi verificado diferença estatística significativa entre os tratamentos. Porém, nas plantas tratadas com P_{AP} , a inoculação reduziu a fluorescência variável nas duas cultivares estudadas (Figura 7).

Os tratamentos com T_{AP} e AP não diferiram do grupo controle (Figura 7 – 6 DAT). Aos 10 dias, não se verificou interação entre os fatores avaliados. Contudo, em média, os cultivares diferiram-se estatisticamente entre si (Figura 7 – 10 DAT).

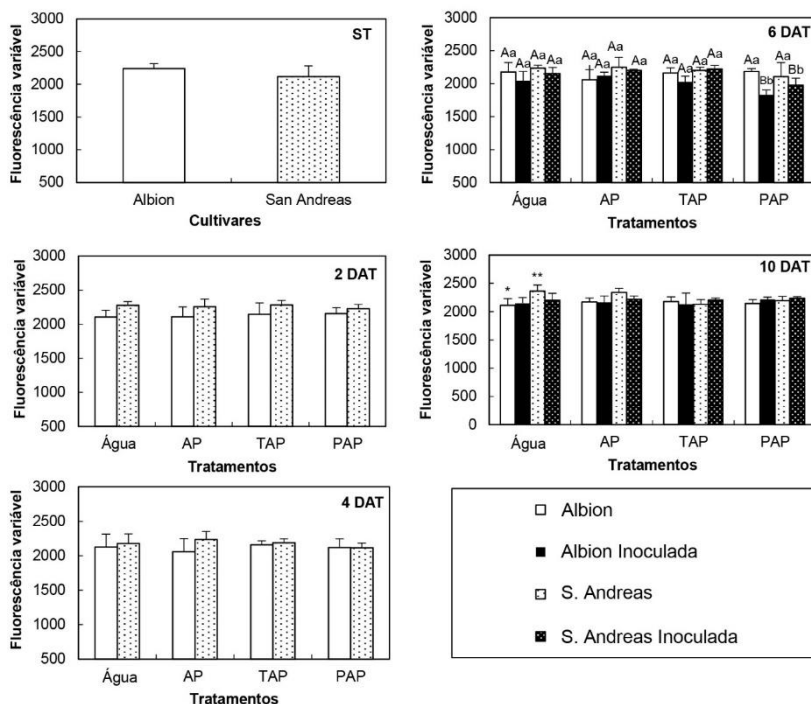


Figura 7. Fluorescência variável (Fm) em folha de morangueiro sem tratamento (ST) aos 2, 4, 6 e 10 dias após o tratamento (DAT) com água (controle), suspensão polissacarídica da babosa (AP, 1,5 mg.ml⁻¹), emulsão de óleo de tea tree (TAP) ou com nanoemulsão de óleo de palmarosa (PAP). Barras de erros indicam o desvio padrão. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas, letras minúsculas entre tratamentos e asterisco entre cultivares de acordo com o teste SNK (5%).

3.3.11. Microscopia de varredura

Não foi verificado diferença entre as cultivares com relação ao número e morfologia dos estômatos. No momento da coleta, todos os estômatos apresentaram o tamanho da abertura estomática similar entre si (dados não mostrados).

Observou-se nas folhas da Cultivar San Andreas, tratadas com água e inoculadas (Figura 8D), a formação de um biofilme bacteriano, o

qual não foi verificado na superfície foliar das plantas tratadas com AP e T_{AP} e inoculadas (Figura 8E e F). As imagens das plantas inoculadas e tratadas com AP e T_{AP} não se mostraram diferentes das não inoculadas (Figura 8A, B e C).

Visualmente, foi possível verificar uma maior quantidade de cera epicuticular sobre a folha da cultivar Albion (Figura 8G, H e I) do que sobre a da cultivar San Andreas (Figura 8A, B e C). Além disso, notou-se que a formação do biofilme bacteriano na superfície das folhas da cultivar Albion (Figura 8J), tratadas com água, foi maior do que a observada sobre a cultivar San Andreas (Figura 8D). Nos morangueiros da cultivar Albion, tratadas com T_{AP} , não se notou o crescimento bacteriano sobre a superfície foliar (Figura 8L). Contudo, nas plantas tratadas com AP, a formação do biofilme foi constatada (Figura 8K).

Superfícies foliares, submetidas à emulsão de óleo essencial de Tea tree, apresentaram modificações na cera epicuticular (Figura 8I e L).

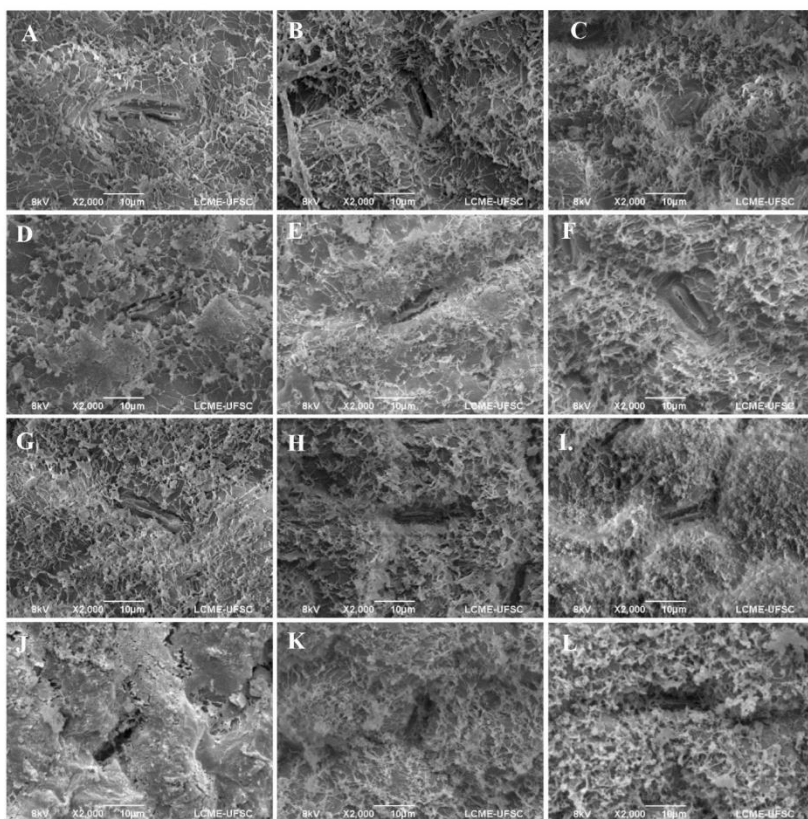


Figura 8. Microscopia de varredura da superfície foliar de morangueiros da cultivar Albion e San Andreas, inoculados ou não com *Xanthomonas fragariae*, aos 6 dias após a aplicação da suspensão polissacarídica da babosa (AP) ou emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}). San Andreas não inoculada tratada com Água (A); San Andreas não inoculada tratada com AP (B); San Andreas não inoculada tratada com T_{AP} (C); San Andreas inoculada e tratada com Água (D); San Andreas inoculada e tratada com AP (E); San Andreas inoculada e tratada com T_{AP} (F); Albion não inoculada e tratada com Água (G); Albion não inoculada tratada com AP (H); Albion não inoculada tratada com T_{AP} (I); Albion inoculada e tratada com Água (J); Albion inoculada e tratada com AP (K); Albion inoculada e tratada com T_{AP} (L).

3.4. DISCUSSÃO

A suspensão polissacarídica da babosa (AP) controlou significativamente a doença provocada por *X. fragariae* em plantas da cultivar Albion e San Andreas. Contudo, a adição de óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) ou palmarosa (*Cymbopogon martinii*) ao preparado de polissacarídeo potencializou a capacidade de AP de reduzir a severidade da mancha angular na cultivar Albion. Resultados semelhantes foram observados em estudo anterior (Luiz et al., 2017), onde AP, a emulsão de óleo de tea tree (T_{AP}) e emulsão de óleo de palmarosa (P_{AP}) reduziram significativamente o aparecimento dos sintomas da mancha angular do morangueiro.

De acordo com Luiz et al. (2017), assim como a severidade da mancha angular, as atividades de superóxido dismutase, peroxidases, catalases e fenilalanina-amônia-liase foram influenciadas pela aplicação de AP, T_{AP} e P_{AP}, principalmente na cv. Albion, a mais suscetível ao patógeno. Mesmo com modificações na atividade de enzimas que levam à formação ou oxidação de polifenóis, não havia sido observada a influência dos tratamentos no teor de compostos fenólicos totais, utilizando a metodologia descrita por Mccue et al. (2000). Contudo, diferença significativa foi encontrada na concentração destes metabólitos secundários entre cultivares, com maior teor em San Andreas quando comparada com a Albion. Isso foi confirmado no presente estudo, utilizando-se a técnica da varredura espectrofotométrica e HPLC.

Utilizando as técnicas mencionadas anteriormente, foi possível verificar a influência das preparações sobre a concentração de metabólitos secundários. Na varredura espectrofotométrica, por exemplo, observou-se que as absorbâncias do extrato foliar da cv. San Andreas, quando mensuradas de 300 a 680 nm, apresentavam-se maiores do que o da cv.

Albion. Isto indica que, no memento da coleta, as folhas apresentavam uma maior concentração de compostos de natureza diversa, como compostos fenólicos, clorofila e carotenoides, na cultivar menos suscetível. A alta concentração de determinados compostos, por sua vez, pode ter contribuído com o atraso da evolução dos sintomas da mancha angular na San Andreas e ajuda a explicar o menor nível de suscetibilidade da cultivar em relação à Albion.

As preparações de babosa não alteraram o perfil espectrofotométrico do extrato de folhas da cv. San Andreas. Porém, na cv. Albion, constatou-se que AP, T_{AP} e P_{AP}, após 4 dias da pulverização, foram capazes de elevar a concentração de determinados compostos nas folhas, principalmente daqueles mensurados de 300 a 350 nm. Dentre os compostos foliares que absorvem luz nos comprimentos de onda entre 250 e 350 nm estão os flavonóides (SISA et al., 2010), que são compostos fenólicos propensos à oxidação a quinonas (HAVSTEEN, 2002), moléculas consideradas tóxicas aos microrganismos, e que podem ter contribuído para a redução da severidade da mancha angular nas plantas tratadas com suspensão, emulsão ou nanoemulsão. Na faixa de 355 a 450 nm, verificou-se que T_{AP} e P_{AP} elevaram a absorbância dos extratos foliares. Nestes comprimentos de onda, podem ser detectados alguns pigmentos como os carotenoides, que são responsáveis pela proteção da clorofila contra o excesso da luz (SIMS; GAMON, 2002).

Dois dias após a inoculação das plantas da cultivar Albion, ou seja, aos 6 dias da aplicação dos tratamentos, verificou-se que AP, T_{AP} e P_{AP} foram capazes de elevar a absorbância dos extratos foliares a 670 nm, com relação aos tratados com água destilada. Este comprimento de onda está compreendido entre a faixa dos utilizados para determinação da clorofila (660 – 680 nm) (SIMS; GAMON, 2002). Por isso, o resultado alcançado pode estar relacionado à baixa severidade da doença nas plantas submetidas às emulsões, onde a porcentagem de área foliar verde e saudável é maior, e à elevada área foliar necrosada nas folhas tratadas com água, onde a área foliar verde e saudável é menor.

A menor concentração de clorofilas nas folhas tratadas com água pode comprometer significativamente a produção do morango, já que as mesmas, segundo Krause and Weis (1991), estão envolvidas diretamente com a fotossíntese e produção de energia para o vegetal.

Além de modificações na concentração de clorofila nas plantas inoculadas da cultivar Albion, aos 6 dias também foi possível verificar uma redução da concentração de compostos foliares que absorvem luz nos comprimentos de onda entre 300 e 450 nm. Neste sentido, as

testemunhas apresentaram uma menor concentração destes compostos com relação aos submetidos aos demais tratamentos. Nesta faixa estão compreendidas diversas classes de fenólicos, como por exemplo, os flavonoides.

Para a identificação do acúmulo e do local de deposição de compostos fenólicos em folhas de morangueiro, realizou-se a microscopia de fluorescência. Neste experimento, antes da inoculação, não foi possível verificar acúmulo de polifenóis no tecido foliar da cultivar Albion. Contudo, após a introdução do patógeno, notou-se no grupo controle o crescimento bacteriano, acúmulo de compostos fenólicos no interior da folha e deformação da célula vegetal. Imagens semelhantes foram observadas nas testemunhas da cultivar San Andreas.

O morangueiro possui diversas nervuras secundárias que podem atuar na defesa contra patógenos. Estas nervuras, por sua vez, podem restringir o crescimento inicial da bactéria *X. fragariae* no interior das folhas (BESTFLEISCH et al., 2014; HILDEBRAND; SCHROTH; WILHELM, 1967). Além disso, na tentativa de evitar o desenvolvimento da mancha, a planta pode acumular metabólitos secundários no interior do vegetal (KIM et al., 2016), conforme o observado no presente estudo.

Mesmo com o crescimento da massa bacteriana em um espaço limitado pelo acúmulo de compostos fenólicos e nervuras secundárias, verificou-se a evolução dos sintomas da mancha angular nas plantas do grupo controle. O desenvolvimento da doença ocorre, pois, o tecido foliar pode se romper e formar um pus sobre a parte abaxial da folha. Além disso, os vasos secundários podem entrar em colapso, a *X. fragariae* formar lesões maiores e invadir o sistema vascular vegetal (BESTFLEISCH et al., 2014; HILDEBRAND; SCHROTH; WILHELM, 1967).

Apesar das alterações na absorbância de extratos de folhas da cultivar Albion, fator que pode indicar aumento ou redução de metabólitos e pigmentos, não foi possível verificar visualmente o acúmulo de compostos fenólicos em secções foliares desta cultivar, mesmo após a inoculação.

Na cultivar San Andreas, após a inoculação, as plantas previamente tratadas com AP, T_{AP} ou P_{AP} apresentaram acúmulo de compostos fenólicos. Este acúmulo, notado também no grupo controle, pode indicar uma reação de defesa vegetal ao contato com o agente patogênico.

Conforme relatado anteriormente, mesmo com a deposição de fenólicos nas folhas das plantas tratadas com água, o crescimento bacteriano e a desordem celular inerente ao desenvolvimento da doença

ocorreram neste grupo. Esta observação, por sua vez, não foi notada nos morangueiros tratados com a suspensão polissacarídica ou emulsões, onde as células mantiveram-se aparentemente saudáveis.

Os acúmulos observados em microscópio de fluorescência podem se tratar da lignina, composto intimamente relacionado com a proteção vegetal (MIEDES et al., 2014). As análises bioquímicas confirmaram esta hipótese, onde a presença e aumento da concentração do polímero foi detectada nas plantas inoculadas da cultivar San Andreas previamente tratadas com AP e P_{AP}. Estes resultados, demonstram a capacidade dos referidos tratamentos em ativar mecanismos de defesas vegetais contra o agente causal da mancha angular.

A não alteração na concentração de lignina nas plantas da cultivar Albion não indica a incapacidade dos tratamentos em ativar os mecanismos de defesa latentes do morangueiro. Provavelmente, a resposta de proteção a patógenos na cultivar mais suscetível foi mais lenta do que na cultivar San Andreas, por tanto, o acúmulo não foi percebido no tempo de coleta estabelecido na pesquisa. Esta hipótese pode ser fortalecida, já que em estudos anteriores observou-se a ativação de enzimas de defesa em Albion que poderiam levar ao aumento da lignina na estrutura vegetal (Luiz, et al. 2017). Além disso, os morangueiros podem ter reduzido ou aumentado a concentração de outros compostos fenólicos, distintos dos precursores da lignina, que também atuam na defesa.

Para a identificação da gama de metabólitos secundários da classe dos fenólicos, efetuou-se a análise de HPLC. Nesta análise foi possível detectar a presença de 13 compostos nas folhas de morangueiro. Destes, 7 foram identificados (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido sirínico, epigallocatequina galato e ácido salicílico).

A quantidade de ácido gálico por g de massa fresca, nos morangueiros não inoculados da cultivar Albion e San Andreas, foi incrementada após a aplicação de AP, T_{AP} e P_{AP} sobre os trifolios. Aumento da concentração do ácido orgânico também foi observado após a inoculação da cultivar Albion. O ácido gálico é um composto antimicrobiano e é o precursor da síntese de taninos hidrolizáveis, que inibem a atividade de herbívoros (KIM et al., 2016). Neste sentido, alterações na concentração deste ácido orgânico podem restringir o desenvolvimento de doenças vegetais, como por exemplo, da mancha angular do morangueiro.

O ácido gálico não foi o único a sofrer alterações em resposta à infecção da *X. fragariae*. Aumento na concentração de ácido clorogênico

também foi observado, principalmente nas plantas inoculadas da cultivar Albion tratadas com T_{AP} e P_{AP} e nas não inoculadas da cultivar San Andreas tratadas com AP. Estas alterações também podem ter contribuído para a redução da severidade da mancha angular do morangueiro, pois, o ácido clorogênico desempenha um papel importante na resistência das plantas a doenças.

De acordo com Karlund et al. (2014) a concentração do ácido clorogênico pode ser alterada após o reconhecimento de moléculas elicitoras. Além disso, pode desempenhar um papel importante na indução de resistência vegetal por apresentar atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos. A atividade antibacteriana deste ácido fenólico parece estar baseada na sua capacidade de modular a permeabilidade da membrana externa e plasmática do patógeno (LOU et al., 2011).

A concentração do ácido ferúlico, assim como os demais ácidos fenólicos mencionados, foi influenciada pela aplicação dos tratamentos. AP, por exemplo, elevou os níveis do composto nas plantas da cultivar Albion e San Andreas. O ácido ferúlico é um composto fenólico que está diretamente envolvido com a associação da lignina com as hemiceluloses da parede celular. Este ácido orgânico, sintetizado na via dos fenilpropanóides, pode esterificar glicanos e se ligar a ligninas e outros resíduos feruloil esterificados. Com estas ligações, formam-se os oligômeros que interligam os polímeros da parede, tornando-a ainda mais rígida (DOS SANTOS et al., 2008). Esta rigidez, por sua vez, pode evitar a penetração de agentes patogênicos na célula.

Além dos compostos anteriormente, verificou-se modificações nas concentrações do ácido vanílico e ácido siringico após a aplicação da suspensão polissacarídica da babosa, nanoemulsão e emulsão de óleos essenciais. AP e P_{AP}, por exemplo, mesmo em plantas não inoculadas, foram capazes de aumentar a concentração de ácido vanílico e siringico nas folhas da cultivar Albion e San Andreas. Além disso, T_{AP} elevou a quantidade dos ácidos fenólicos após a sua aplicação sobre as ambas as cultivares. Estas elevações indicam a modificação no metabolismo na planta e ativação da via fenilpropanóides em resposta à aplicação dos tratamentos e à inoculação do agente patogênico.

A epigalocatequina galato (EGCG), juntamente com os outros compostos fenólicos identificados, foi elevada após a pulverização de AP, T_{AP} e P_{AP} sobre a cultivar Albion. Este flavonoide, além de ajudar as plantas a adaptarem-se a diferentes condições ambientais, fornece resistência contra agentes patogênicos (CHANDRA et al., 2015). Apesar

da concentração do ácido ter sido elevada nas plantas da cultivar Albion, na San Andreas verificou-se uma redução, principalmente após a inoculação. Esta redução, por sua vez, pode indicar a transformação do fenólico em outras substâncias, através da oxidação enzimática por ação das polifenoloxidasas.

As alterações mencionadas anteriormente indicam a ativação de mecanismos de defesa latentes das plantas de morango. Uma das moléculas indicadoras e sinalizadoras da indução de resistência vegetal é o ácido salicílico (KIM et al., 2016), o qual também foi detectado e alterado após a aplicação dos tratamentos, principalmente nas plantas da cultivar Albion pulverizadas com AP.

Em conjunto com as alterações na concentração de compostos fenólicos, mudanças fisiológicas, como por exemplo, na taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática também, podem acontecer durante o processo de indução de resistência.

No presente estudo foi verificado que as plantas do grupo controle da cv. Albion, após a inoculação, sofreram um aumento significativo na fotossíntese, condutância estomática e transpiração. Isto indica que as trocas gasosas e a perda de água neste material vegetal foram intensificadas após o contato com o agente patogênico. As plantas tratadas com P_{AP} da cultivar Albion não apresentaram elevação dos fatores mensurados após introdução da *X. fragariae* e esta resposta bioquímica-estrutural, conseqüentemente, pode ter contribuído para a menor severidade da doença neste grupo. Nas plantas do grupo controle da cultivar San andreas, por outro lado, a condutância e transpiração foram menores após a inoculação, um outro fator que explicaria a maior resistência inata dessa cultivar comparada a Albion, já que isso representaria fechamento estomático em resposta ao patógeno.

Segundo Grimmer et al. (2012), logo no início do contato entre uma determinada bactéria fitopatogênica e seu hospedeiro pode ocorrer o fechamento dos estômatos presentes no limbo foliar. Esta resposta à presença de um agente patogênico, denominada de resposta imune inata, é desencadeada por um padrão molecular do microrganismo, para impedir a entrada do patógeno através dos poros estomáticos. Alguns estudos demonstraram que, para superar a resposta imune inata da planta, o agente patogênico pode liberar outras moléculas (efetores), que podem provocar uma reabertura estomática e manter os poros abertos por um determinado período (Melotto et al., 2006) e, desta forma, aumentar a condutância estomática, transpiração e, conseqüentemente, a fotossíntese.

Para analisar o efeito das preparações contendo babosa e óleos essenciais sobre a abertura e fechamento estomático, efetuou-se a microscopia de varredura. No entanto, não foi possível perceber influência dos preparados sobre o parâmetro analisado (dados não mostrados). Apesar disso, verificou-se a formação de um biofilme bacteriano nas testemunhas, o qual não foi verificado ou observado em baixa quantidade na superfície foliar das plantas previamente tratadas com T_{AP} ou AP, respectivamente. Provavelmente, os tratamentos evitaram a penetração da bactéria via estômato e dificultaram a formação do biofilme.

A condutância estomática, transpiração e fotossíntese ocupam uma posição central na produção de energia para as plantas. Além disso, o desempenho do processo fotossintético pode fornecer informações acerca da relação entre o metabolismo interno do vegetal e o ambiente externo. Estas informações podem ser capturadas através da análise da fluorescência emitida pelos pigmentos cloroplastídicos (BAKER, 2008; PERCIVAL; FRASER; OXENHAM, 2003).

Com relação à fluorescência máxima da clorofila, verificou-se, no sexto dia após a aplicação dos tratamentos sobre os morangueiros, uma interação significativa entre inoculação e tratamento. Sendo assim, em média, neste período de avaliação, foi possível perceber que as plantas inoculadas apresentaram valores de fluorescência máxima menores do que as emitidas pelas plantas não inoculadas. Além disso, plantas desafiadas com o patógeno e tratadas com P_{AP} demonstraram os menores índices de fluorescência, quando comparadas com as plantas submetidas aos demais tratamentos. Dados semelhantes foram observados na análise da fluorescência variável da clorofila. Estes resultados podem indicar estresse devido ao contato de P_{AP} e do patógeno com a planta, o qual pode influenciar negativamente a capacidade dos morangueiros em promover a transferência de elétrons.

De uma maneira geral, verificou-se que AP, T_{AP} e P_{AP} são capazes de promover modificações na produção de metabólitos secundários como os compostos fenólicos (aumentos nos níveis, na maioria dos casos), além de alterações fisiológicas relacionadas a? e redução da severidade da mancha angular. Devido às evidentes mudanças, acredita-se que os óleos essenciais, juntamente com a suspensão polissacarídica da babosa, são capazes de ativar o mecanismo de defesa latente do morangueiro e, desta forma, promover um controle significativo dos sintomas inerentes da doença. Esse estudo ainda aponta fatores (maior concentração de

compostos fenólicos) que ajudam a explicar o maior nível de resistência inata da cv. San Andreas em relação à Albion.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsas de estudo. Ao Sr. Dionisio da Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda, por fornecer a babosa utilizada neste estudo. À empresa Samia aromaterapia pelos óleos essenciais fornecidos.

REFERÊNCIAS

ANSARI, M. A.; RAZDAN, R. K. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. **Indian journal of malariology**, v. 32, p. 104–111, 1995.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89–113, 2008.

BESTFLEISCH, M. et al. Resistance and systemic dispersal of *Xanthomonas fragariae* in strawberry germplasm (*Fragaria* L.). **Plant Pathology**, v. 64, p. 71–80, 2014.

BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 229–238, 2006.

CHANDRA, S. et al. Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. **Nature**, p. 1–14, 2015.

CONRATH, U. et al. Priming for Enhanced Defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 97–119, 2015.

COQUEIRO, D. S. O.; MARASCHIN, M.; PIERO, R. M. DI. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7–

8, p. 488–494, 2011.

DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 256–266, 2000.

DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 5, p. 371–390, 2002.

DOS SANTOS, W. et al. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid . The Possible Mode of Action. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1230–1241, 2008.

GRIMMER, M. K.; FOULKES, M. J.; PAVELEY, N. D. Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 12, p. 4321–4331, 2012.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, 2002.

HENRIQUES, F. S. Leaf Chlorophyll Fluorescence: Background and Fundamentals for Plant Biologists. **Botanical Review**, v. 75, n. 3, p. 249–270, 2009.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend The Quarterly Review of Biology The Dilemma of Plants: To grow or defend. **The Quarterly Review of Biology**, v. 67, n. 3, p. 283–335, 1992.

HILDEBRAND, D. C.; SCHROTH, M. N.; WILHELM, S. Systemic invasion of strawberry by *Xanthomonas fragariae* causing vascular collapse. **Phytopathology**, v. 57, p. 1260, 1967.

HOYOS, J. M. A. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270–284, 2012.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.

KARLUND, A. et al. Polyphenols in strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves induced by plant activators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 20, p. 4592–4600, 2014.

KIM, M.-S. et al. Metabolic response of strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaves exposed to the Angular leaf spot bacterium (*Xanthomonas fragariae*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 9, p. 1889–1898, 2016.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil : atividade de enzimas , síntese de fenóis e lignina e biomassa . **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 107–114, 2010.

LATOUCHE, G. et al. Influence of constitutive phenolic compounds on the response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves to infection by *Plasmopara viticola*. **Planta**, v. 237, n. 1, p. 351–361, 2013.

LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry**, v. 661, n. 2, p. 23–67, 2006.

LOU, Z. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 398–403, 2011.

LUIZ, C. et al. Protection of tomato by polysaccharides from aloe barbadensis reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, n. 2, p. 387–393, 2012.

LUIZ, C. et al. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170–177, 2016.

LUIZ, C. et al. Nanoemulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, (no prelo), 2017.

LUIZ, C.; ROCHA NETO, A. C.; DI PIERO, R. M. Resistance to

Xanthomonas gardneri in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 1, p. 119–127, 2015.

MALLAVARAPU, G. R. et al. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and the herb of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) wats. var. motia Burk.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 167–169, 1998.

MCCUE, P. et al. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 603–613, 2000.

MELOTTO, M. et al. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 969–980, 2006.

MIEDES, E. et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 358, p. 1–13, 2014.

PERCIVAL, G. C.; FRASER, G. A.; OXENHAM, G. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal Of Arboriculture**, v. 29, n. 2, p. 61–65, 2003.

SHAO, X. et al. Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 94–101, 2013.

SIMS, D. A.; GAMON, J. A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages 2002.pdf. **Remote Sensing of Environment**, v. 81, p. 337–354, 2002.

SISA, M. et al. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010.

STADNIK, M. J. ; MARASCHIN, M. Inducao de resistencia de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). . **Manejo ecológico de doenças de plantas**. 1. ed. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p. 221–244.

STATISOFT. **STATISTICA 8.0**, 2007.

VAN LOON, L. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753–765, 1997.

VERGNES, S. et al. Foliar treatments with *Gaultheria procumbens* essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. September, p. 1–8, 2014.

WALTERS, D. R.; NEWTON, A. C.; LYON, G. D. Induced resistance: Helping plants to help themselves. **Biologist**, v. 52, p. 28–33, 2005.

WAN, J.; ZHANG, X.; STACEY, G. Chitin signaling and plant disease resistance. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 10, p. 831–833, 2008.